

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**"EVALUACIÓN DE LA TERAPIA CON TEMOZOLOMIDA,
PANOBINOSTAT Y EXTRACTO DE *LOPHOPHORA WILLIAMSII* EN LA
INDUCCIÓN DE MUERTE INMUNOGÉNICA EN UN MODELO MURINO
DE GLIOMA"**

POR

Q.B.P. LUIS MARIO MADRIGAL DE LEÓN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

JUNIO 2020

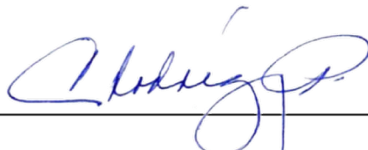
**“EVALUACIÓN DE LA TERAPIA CON TEMOZOLOMIDA, PANOBINOSTAT Y
EXTRACTO DE *LOPHOPHORA WILLIAMSII* EN LA INDUCCIÓN DE MUERTE
INMUNOGÉNICA EN UN MODELO MURINO DE GLIOMA”**

Comité de Tesis



Dr. Moisés Armides Franco Molina

Director de Tesis



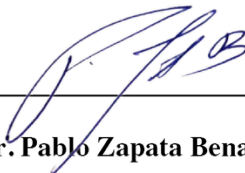
Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Secretario



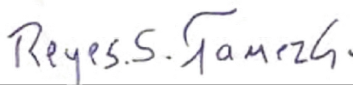
Dra. Ana Carolina Martínez Torres

Vocal



Dr. Pablo Zapata Benavides

Vocal



Dr. Reyes Tamez Guerra

Vocal



Dr. Alberto Camacho Morales

Asesor externo

Este trabajo de investigación (Tesis) se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del Laboratorio de Inmunología y Virología.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas: Dr. Moisés A. Franco Molina, Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Dra. Ana Carolina Martínez Torres, Dr. Reyes Tamez Guerra, Dr. Pablo Zapata Benavides y el Dr. Alberto Camacho Morales por formar parte del Comité de Tesis, por sus valiosos comentarios, sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

A la unidad de Inmunoterapia del laboratorio de Inmunología y Virología del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por permitirme el uso de su equipo, material y su invaluable ayuda en el desarrollo de este trabajo.

Al CONACYT por su apoyo económico durante la realización de este posgrado.

DEDICATORIA

Agradezco a Dios por permitirme vivir y realizar este trabajo de investigación y una maestría.

A mi familia, Blanca Angélica, Juan Mario, María Angélica, Jorge Iván, Juan Pablo y José Ángel por su apoyo, confianza, respeto a mis decisiones, su carió, bromas, enojos, por ser mi familia.

A mis prim@s ti@s por brindarme apoyo, palabras de aliento y respeto.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por permitirme realizar este posgrado así como el proyecto dentro de sus instalaciones. Al CONACYT por el apoyo económico.

Agradezco al Dr. Moisés Franco por aceptarme en su laboratorio desde el servicio social, por darme su confianza, apoyo, conocimiento, consejos, amabilidad, todo para desarrollarme profesional y personalmente, muchas gracias por todo.

Agradezco a Silvia Elena Santana Krímskaya, ya que sin ella, me hubiera rendido desde el principio, gracias por tu amistad, por tu apoyo, todo lo que me enseñaste es muy valioso, quizá no haya sido muy afable contigo, sin embargo algún día te lo pagaré, eres excelente persona, investigadora, aunque no muchos lo noten, eres genia, muchas gracias por todo (hasta por el maquillaje, fue divertido xD) ñ_ñ.

Gracias Paola Leonor García Coronado, por los abrazos, el apoyo, las bromas, los consejos, tu amistad, fueron geniales las aventuras que pasamos, sufrimos, nos divertimos.

También agradezco a Kenia Arisbe Moreno Amador, por su amistad, confianza, bullying, los chismes, la diversión, el peyote xD.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, Cristian Navil Padilla Esparza, Gustavo Sobrevilla Hernández, Antonio Santamaría, y Debani, por su compañerismo y amistad, así como su apoyo, la diversión, el bullying.

También agradezco a mis compañeros de distintos laboratorios: Teo, Raúl, Aarón, Helen, Kenny, Ale, Felipe, Chago, Sarita, el Dr. Césarín. A mis amigos Óscar, César, Dani, Julio, Edgar, Erikita, Yaris Yaris, Carme, Cared, Dulce, Dayrita, por su apoyo durante este proyecto y su amistad. A mis compañeros de maestría, Oziel, Edder, Tania, Moni, Nefertari, Roberto, Azael, Limón, Gabo, Lucero, por siempre estar ahí y apoyarnos unos a otros.

Agradezco a Fátima Magaly Salas Velázquez, por su apoyo, confianza, motivación, cariño, amor, gracias por mostrarme algo magnífico, increíble, indescriptible, una hermosa experiencia y aunque no sabemos que nos depara el futuro, se que has sido la persona más increíble, paciente, fuerte, atenta; mi querida alumna, mi gran amiga, mi idilica Sherlock. Gracias por todo. Moriarty.

Por último, agradezco a las ratas que me prestaron su vida para realizar este proyecto Q.E.P.D.

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	IV
I. RESUMEN	VIII
II. ABSTRACT	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Sistema Nervioso	3
2.2 Células del sistema nervioso	4
2.3 Cáncer	6
2.4 Tipos de cáncer en sistema nervioso	12
2.5 Tratamiento convencionales para el cáncer de SNC	15
2.6 Muerte inmunogénica (ICD)	16
2.6.1 Formas de ICD	17
2.6.2 ICD inducida por la quimioterapia	18
2.6 Temozolomida	20
2.7 Panobinostat	21
2.8 <i>Lophophora williamsii</i> (peyote)	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVO GENERAL	25
6. OBJETIVOS PARTICULARES	25
7. MATERIAL Y MÉTODOS	26
7.1 Mantenimiento de la línea celular	26
7.2 Reactivos y anticuerpos	26
7.3 Animales	26
7.4 Efecto de la temozolomida, panobinostat y extracto de <i>Lophophora williamsii</i> sobre la viabilidad de las células C6	27
7.5 Prueba de sensibilización a drogas	27
7.6 Prueba de recuperación	27
7.7 Bromuro de etidio y naranja de acridina	28
7.8 Inmunización con lisados celulares	28

7.9 Determinación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs).....	29
7.10 Análisis estadístico	30
8. RESULTADOS	31
8.1 Efecto citotóxico de los tratamientos sobre la línea celular C6.....	31
8.2 Tipo de muerte celular.....	35
8.3 Tipo de muerte celular del ensayo de recuperacion	36
8.4 Ensayo de recuperación celular.....	37
8.5 Efecto de los tratamientos (TMZ, LW,PAN y COM) en la liberación de DAMPs.....	40
8.6 Efecto de las vacunas con lisados tumorales sobre el volumen tumoral	42
9. DISCUSIÓN	43
10. CONCLUSIONES.....	47
11. PERSPECTIVAS.....	48
12. BIBLIOGRAFÍA	49
13. RESUMEN BIOGRÁFICO	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido

Figura 1.	Porcentaje de incidencia y muerte por cáncer en México.....	12
Figura 2.	Requerimientos diferenciales para la inmunogenicidad de la muerte celular.....	18
Figura 3.	Mecanismos de ICD inducido por quimioterapia.....	19
Figura 4.	Reacción química de conversión de la temozolomida a AIC.....	21
Figura 5.	Estructura química del panobinostat.....	22
Figura 6.	Efecto citotóxico de la temozolomida (TMZ) en la línea celular C6.....	32
Figura 7.	Efecto citotóxico del extracto de <i>Lophophora williamsii</i> (LW) en la línea celular C6.....	32
Figura 8.	Efecto citotóxico del vehículo metanol (MET) en la línea celular C6.....	33
Figura 9.	Efecto citotóxico del panobinostat (PAN) en la línea celular C6.....	33
Figura 10.	Efecto citotóxico de la combinación de tratamientos (TMZ+PAN+LW) en la línea celular C6.....	34
Figura 11.	Efecto citotóxico de la combinación de tratamientos (PAN+LW) sensibilizando con TMZ.....	34
Figura 12.	Micrografía correspondiente al tipo de muerte celular de los tratamientos sobre la línea celular C6.....	35
Figura 13.	Micrografía de la prueba de recuperación correspondiente al tipo de muerte celular de los tratamientos sobre la línea celular C6.....	36
Figura 14.	Prueba de recuperación de las células C6 tratadas con TMZ durante 24 horas.....	37

Figura 15.	Prueba de recuperación de las células C6 tratadas con LW durante 24 horas.....	38
Figura 16.	Prueba de recuperación de las células C6 tratadas con PAN durante 24 horas.....	38
Figura 17.	Prueba de recuperación de las células C6 tratadas con PAN durante 72 horas.....	39
Figura 18.	Prueba de recuperación de la combinación de tratamientos (PAN+LW) sensibilizando con TMZ.....	39
Figura 19.	Niveles basales de DAMPs.....	40
Figura 20.	Liberación de DAMPs.....	41
Figura 21.	Medición del volumen tumoral.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido

Tabla 1. Tendencia de incidencia y muerte por cáncer en México	11
Tabla 2. Señales de peligro en la muerte inmunogénica.....	17

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

*	Diferencia significativa
**	Alta diferencia significativa
%	Por ciento
±	Más-menos
<	Menor que
=	Igual
A	Ancho
AGER	Receptor específico de producto final de glicosilación avanzada
AIC	5- aminoimidazola-4- carboxiamida
ANXA1	Anexina 1
ARB	Asociado a retinoblastoma
ATP	Trifosfato de adenosina
Bax	Subfamilia de proteínas pro-apoptóticas
BBB	Barrera hematoencefálica
BCA	Ensayo del ácido bicinconinico
Bcl-2	Subfamilia de proteínas anti-apoptóticas
Bcl-xL	Proteína anti-apoptótica
Bim	Proteína pro-apoptótica
°C	Grados centígrados
C6	Línea celular de astrocitoma murino
CALR	Calreticulina
CO ₂	Dioxido de carbono
COM	Sensibilización con TMZ y tratamiento con PAN+LW
CpG	Islas CpG
CTL	Linfocito T citotóxico
CTR	Control
CXCL10	Ligando de quimiocina CXC 10
CXCR3	Receptor de quimioquinas 3

DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DC	Células dendríticas
DL	Dosis letal
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eIF2A	Factor de iniciación eucariótica 2
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ER	Retículo endoplásmico
FDA	Food and Drug Administration
FPR 1	Receptor del péptido formilo 1
g	Gramo
h	Hora
HDACs	Histona deacetilasas
HMGB1	High mobility group box 1
HSP 70	Proteína de choque termico 70
HSP 90	Proteína de choque termico 90
ICD	Muerte celular inmunogénica
IFN	Interferon
IFNAR	Interferón α / β -receptor de la subunidad 1
Igf1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
Igf2	Factor de crecimiento insulínico tipo 2
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina 1 β
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
kDa	Kilo Dalton
L	Largo
LCR	Líquido cefalorraquideo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LRP1	proteína 1 relacionada con el receptor de LDL

LW	Extracto metanólico de <i>Lophophora williamsii</i>
M	Molaridad
MDSCs	Células supresoras derivadas mieloides
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milimetro
MTIC	5-(3-methyltriazene-1-yl)imidazole-4-carboxamide)
n.s	No significativo
NaCl	Cloruro de Sodio
NIH	National Institutes of Health
NK	Célula Natural Killer
nm	Nanometro
NOM	Norma Oficial Mexicana
P	Probabilidad de resultado de la hipótesis nula
P2RX7	receptor purinérgico P2X7
P2RY2	receptor purinérgico P2Y2
PAN	Panobinostat
PBS	Buffer de fosfatos salino
PDIA3	Proteína disulfuro isomerasa miembro de la familia A3
pH	Potencial de hidrogeno
Puma	Proteína pro-apoptótica
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecilsulfato
SET 2X	Buffer de lisis SET 2X
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral- β
TLR	Receptor tipo Toll
TMZ	Temozolomida

TNEP	Tumores neuroectodérmicos primitivos
TP53	Proteína P53
Tregs	Células T reguladoras
TSP-1	Trombospondina-1
U	Unidades
v	Volumen
VEGF-A	Factor de crecimiento endotelial vascular-A
λ	Longitud de onda
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar

I. RESUMEN

La muerte celular inmunogénica se caracteriza por la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) y la inducción de memoria inmunológica específica de antígeno lo que evitaría la recurrencia del tumor. El objetivo del presente estudio fue determinar si el efecto citotóxico de temozolomida (TMZ), panobinostat (PAN) y extracto metanólico de *Lophohora williamsii* (LW) solo o en combinación sobre las células C6 de glioma murino tienen la capacidad de inducir muerte inmunogénica. La citotoxicidad celular se determinó mediante la prueba de resazurina. Las proteínas de choque térmico (HSP) 70, HSP90 y la high mobility group box 1 (HMGB1) se identificaron mediante ELISA. Se realizaron ensayos *in vivo* en un modelo de rata empleando la línea celular C6. Los resultados demostraron que los tratamientos con TMZ, PAN y LW solos o en combinación indujeron citotoxicidad celular de una manera dependiente de dosis y tiempo dependiendo del compuesto usado. Por otra parte, se demostró que el empleo conjunto de TMZ, PAN y LW en sus diferentes dosis DL₂₀, 30 y 50 no indujeron citotoxicidad celular a las 24 h.

Todos los tratamientos provocaron la liberación de HSP70, HSP90 y HMGB1. Los experimentos *in vivo* demuestran que los tratamientos con TMZ, PAN, LW y su combinación, no tienen la capacidad de inducir muerte inmunogénica, debido a que no impidieron el desarrollo del tumor. En conclusión en el presente estudio todos los tratamientos empleados fueron citotóxicos de manera dependiente de dosis y tiempo en la línea celular C6, sin embargo, no fueron capaces de inducir muerte celular inmunogénica.

La muerte celular inmunogénica se destaca como un importante iniciador de la inmunidad adaptativa, por lo que es un objetivo prometedor para el desarrollo de agentes terapéuticos con aplicaciones oncológicas en combinación con los tratamientos actuales para el glioma o mediante inmunoterapia, generando vacunas a partir de DAMPs y así poder inducir una respuesta inmune adaptativa de memoria contra el glioma para reducir los casos de recurrencia de este tumor e incrementar la supervivencia de los pacientes.

II. ABSTRACT

Immunogenic cell death is characterized by the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs) and the induction of antigen-specific immune memory, which would prevent tumor recurrence. The objective of this study was to determine whether the cytotoxic effect of temozolomide (TMZ), panobinostat (PAN) and methanolic extract *Lophohora Williamsii* (LW) alone or in combination on C6 of murine glioma cells have the ability to induce immunogenic death. Cellular cytotoxicity was determined by the resazurin test. The heat shock proteins (HSP) 70, HSP90 and high mobility group box 1 (HMGB1) were identified by ELISA. In vivo tests were performed in a rat model using the C6 cell line. The results showed that treatment with TMZ, PAN and LW alone or in combination induced cellular cytotoxicity in a dose dependent manner and time depending on the used compound. On the other hand, it was demonstrated that the joint use of TMZ, PAN and LW in their different doses DL20, 30 and 50 did not induce cellular cytotoxicity at 24 h.

All treatments caused the release of HSP70, HSP90 and HMGB1. In vivo experiments show that treatments with TMZ, PAN, LW and their combination do not have the capacity to induce immunogenic death, because they did not prevent tumor development. In conclusion, in the present study, all the treatments used were cytotoxic in a dose and time-dependent manner in the C6 cell line, however, they were not able to induce immunogenic cell death.

La muerte celular inmunogénica se destaca como un importante iniciador de la inmunidad adaptativa, por lo que es un objetivo prometedor para el desarrollo de agentes terapéuticos con aplicaciones oncológicas en combinación con los tratamientos actuales para el glioma o mediante inmunoterapia, generando vacunas a partir de DAMPs y así poder inducir una respuesta inmune adaptativa de memoria contra el glioma para reducir los casos de recurrencia de este tumor e incrementar la sobrevivencia de los pacientes.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el cáncer se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial, debido a que es la segunda causa de muerte y se estima que se convertirá en la primer causa de muerte, superando incluso el número de muertes ocasionadas por enfermedades cardíacas. Se define como una enfermedad multifactorial en donde la célula crece y se multiplica descontroladamente, además es capaz de invadir tejidos y producir metástasis (Fitzmaurice et al., 2017).

El glioma es un tumor cerebral derivado de células gliales, se clasifica dependiendo del tipo de célula transformada: astrocitoma, ependimoma u oligodendroglioma. Actualmente, la tasa de incidencia global de tumores primarios del sistema nervioso central (SNC) es de 10.82 por cada 100,000 personas al año, siendo más recurrente en niños y adultos mayores (de Robles et al., 2015)

El tratamiento convencional aplicado es cirugía, radioterapia y quimioterapia, dependiendo del grado en que se encuentre el glioma. Los fármacos de primera línea empleados por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y recomendados por el National Institute of Health (NIH) son el carboplatino asociado a la vincristina y el ácido 5-aminolevulinico. Sin embargo, en pacientes con recurrencia del tumor se aplica un tratamiento con temozolomida (TMZ), un agente alquilante que penetra la barrera hematoencefálica (BBB) y daña al DNA mediante metilaciones en el mismo (Magaña-Maldonado et al. 2016) .

El glioma virtualmente tiene recurrencia en todos los casos (Park J., 2010) por lo que se buscan agentes con capacidad de inducir muerte celular inmunogénica, debido a que el cáncer sufre un proceso de inmunoección, en donde el tumor evade el sistema inmune, modificando y eliminando marcadores celulares específicos del mismo (Scheriber, 2011).

El proceso de muerte celular inmunogénica, comienza generalmente debido a un estrés celular, lo que provoca la liberación y exposición de patrones moleculares asociados a

daño (DAMPs). Los DAMPs producidos por las células moribundas pueden actuar como adyuvantes y comunicar un estado de peligro al organismo. Sin embargo, estos DAMPs son incapaces de iniciar una respuesta inmune adaptativa a menos que las células moribundas muestren un aumento de la antigenicidad, es decir, poseen epítomos antigénicos que no han obtenido previamente tolerancia central o periférica (Galluzzi, 2016).

Recientemente se han estado empleando nuevos fármacos con distintos mecanismos de acción para tratar el glioma. Uno de estos es el agente epigenético panobinostat (PAN), el cual es un inhibidor de las histonas deacetilasas (HDACs) que afecta principalmente a las histonas 3 y 4, generando cambios en la transcripción de genes, la actividad de proteínas, así como daño al DNA, por lo que promueve la apoptosis y arresto del ciclo celular (Moore, 2016).

Conforme a un auge en donde la población busca remedios naturales, en lugar de medicamentos convencionales por sus efectos secundarios, se decidió utilizar un extracto metanólico de *Lophophora williamsi* (LW), que por su actividad psicotrópica, algún componente del mismo pueda penetrar la BBB para ayudar a combatir el glioma. Éste cactus, generalmente encontrado en la zona norte de México y sur de los Estados Unidos, ampliamente utilizado por los indígenas huicholes en diversos rituales (Rose, 2016) . Se le han asociado diversos efectos alucinógenos debido a estímulos en el sistema nervioso central por la mescalina, produciendo además somnolencia, hambre y sed. Se ha encontrado que extractos metanólicos de este cactus inducen citotoxicidad en distintas líneas celulares de cáncer como la MCF7 y L5178Y-R (Franco-Molina et al., 2003).

Debido a que el glioma representa un gran problema para la sociedad por su baja tasa de sobrevivencia en niños y adultos mayores, además de su alta recurrencia. En este estudio se propone estudiar la capacidad de inducir muerte celular inmunogénica empleando agentes quimioterapéuticos de primera línea y un extracto metanólico de *Lophophora williamsii* en un modelo de glioma C6 en ratas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Sistema Nervioso

El sistema nervioso es una red compleja de estructuras especializadas (encéfalo, médula espinal y nervios) que contralan y regulan la función de diversos órganos y sistemas. El sistema nervioso detecta cambios en el medio interno y externo, evalúa dicha información y responde mediante cambios en músculos o glándulas (Tortora y Tortora 2014).

Se divide en dos subsistemas: a) **Sistema nervioso central (SNC)**, compuesto por el encéfalo y la médula espinal; b) **sistema nervioso periférico (SNP)**, dentro del cual se incluyen los tejidos nerviosos situados fuera del sistema nervioso central (Tortora y Tortora 2014)).

El SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal. El encéfalo es la parte del sistema nervioso central contenida en el cráneo, comprende el cerebro, cerebelo y el tronco encefálico. La médula espinal es la parte del SNC situada en el interior del canal vertebral y se conecta con el encéfalo a través del agujero occipital del cráneo (Tortora y Tortora 2014).

El SNP se encuentra formado por los nervios que conectan el encéfalo y la médula espinal con otras partes del cuerpo. Los nervios que se originan en el encéfalo se llaman nervios craneales, los que se originan en la médula espinal se denominan nervios raquídeos o espinal. Los ganglios, son pequeños acúmulos de tejido nervioso situados en el SNP, contienen cuerpos neuronales y se asocian a nervios craneales o a nervios espinales. Los nervios son haces de fibras nerviosas periféricas que forman vías de información desde los receptores sensoriales hasta el SNC (vías centrípetas) y vías desde el SNC a los órganos efectores (vías centrifugas) (Tortora y Tortora 2014).

2.2 Células del sistema nervioso

Neuronas

Son las células responsables de las funciones atribuidas al sistema nervioso: pensar, razonar, control de la actividad muscular, sentir, etc. Son células excitables que conducen los impulsos que hacen posibles todas las funciones del sistema nervioso.

Las neuronas son una familia heterogenea tanto desde el punto de vista morfológico como funcional, que varían desde células pequeñas redondas que ocupan la capa granulosa interna del cerebelo hasta las grandes células piramidales de Betz de la corteza motora primaria (Cotran et al., 1999). Aunque pueden tener distintas formas y tamaños, todas las neuronas tienen una estructura básica y constan de 3 partes esenciales: cuerpo neural, dendritas y axones.

1. El cuerpo o soma neuronal contiene el núcleo y el citoplasma, con todos sus orgánulos intracelulares, rodeado por la membrana plasmática.
2. Las dendritas son múltiples prolongaciones cortas ramificadas, a través de las cuales la neurona recibe estímulos procedentes de neuronas vecinas en donde se establece una sinapsis o contacto en células.
3. El axón es una prolongación, generalmente única y de longitud variable, a través de la cual el impulso nervioso se transmite desde el cuerpo celular a otras células nerviosas o a otros órganos del cuerpo. Cerca del final, el axón, se divide en terminaciones especializadas que contactarán con otras neuronas u órganos efectores. El lugar de contacto entre dos neuronas o entre una neurona y un órgano efector es una sinapsis.

Astroцитos

Son pequeñas células de aspecto estrellado que se encuentran en todo el SNC. Desempeñan diversas funciones dentro del SNC, ya que son células de sostén pasivas. Forman una armazón estructural y de soporte para las neuronas y los capilares gracias a sus prolongaciones citoplasmáticas. Mantienen la integridad de la barrera hematoencefálica, una barrera física que impide el paso de determinadas sustancias desde los capilares cerebrales al espacio intersticial. Tienen una función de aporte mecánico y metabólico a las neuronas, de síntesis de algunos componentes utilizados por estas y de ayuda a la regulación de la composición iónica del espacio extracelular que rodea a las neuronas (Tortora y Tortora 2014).

Los astroцитos representan las principales células del sostén en el cerebro y muestran algunos de los cambios reactivos más comunes. En el caso de lesiones al parenquima cerebral los astroцитos responden mediante la producción de una densa red de prolongaciones, algo similar a la cicatriz fibrosa que se presenta en cualquier otra parte del cuerpo. Sin embargo, en contraste con los fibroblastos, los astroцитos no producen colagena. Por consiguiente, la “cicatriz” glial se forma sobre todo de prolongaciones citoplásmicas con proteína extracelular escasa o nula (Cotran et al., 1999).

Oligodendrocitos

Las prolongaciones citoplásmicas oligodendrogiales forman mielina y rodean los axones de las neuronas de manera análoga a las células de Schwann del sistema nervioso periférico (Kumar et al., 1997). Su principal función es la síntesis de mielina y la mielinización de los axones de las neuronas en el SNC. Cada oligodendrocito puede rodear con mielina entre 3 y 50 axones. La mielina se dispone formando varias capas alrededor de los axones, de tal forma que los protege y aísla eléctricamente. La mielinización, además, contribuye de forma muy importante a aumentar la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos a través de los axones (Tortora y Tortora 2014).

Células endimarias

Son células ciliadas que tapizan la pared del sistema ventricular y del endimo. Son células móviles que contribuyen al flujo del líquido cefalorraquídeo (LCR).

Las células endimarias que revisten los ventrículos cerebrales se relacionan de manera estrecha con las células cuboidales que revisten los plexos coroideos (Kumar et al., 1997).

Microglia

Las células de la microglia son los principales elementos fagocíticos del sistema nervioso central (SNC) y en su interior pueden acumularse abundantes lípidos para convertirse en macrófagos espumosos, que se denominan células reticulares (Kumar et al., 1997).

Células de Schwann

Son células de la neuroglia situadas en el sistema nervioso periférico, las cuales sintetizan mielina que recubre los axones a este nivel, cada célula rodea a un solo axón (Tortora y Tortora 2014).

Células satélite

Son células de soporte de las neuronas de los ganglios de SNP.

2.3 Cáncer

El nombre cáncer es un término derivado de la palabra griega para cangrejo, *Karkinos*, que usó Hipócrates por vez primera, en los nombres carcinos y carcinoma. Atribuyó este padecimiento a un exceso de bilis negra. El cáncer fue conocido en la antigüedad, ya que en los primeros escritos de griegos y romanos hacen referencia a él. Los tumores en momias egipcias que datan de 5,000 años representan las primeras neoformaciones malignas humanas, aunque existen signos de tumores óseos en dinosaurios y otros animales prehistóricos (Cecil, Smith, y Wyngaarden 1986).

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades, en donde las células se dividen sin control, además son capaces de invadir tejidos cercanos y producir metástasis, esparciéndose a través de la sangre y los sistemas linfáticos. Existen diversos tipos de cáncer. El Carcinoma es un tipo de cáncer que comienza en la piel o en los tejidos que cubren los órganos internos. El sarcoma es un cáncer que comienza en el hueso, cartílago, adipocitos, músculo, vasos sanguíneos u otros tejidos conectivos o de soporte. La leucemia es un tipo de cáncer que empieza en el tejido formador de sangre, como la médula, genera un sin número de células sanguíneas anormales que entran en circulación. El linfoma y el mieloma múltiple son cánceres que se originan del sistema inmune. Los tumores en el sistema nervioso central comienzan en tejidos cerebrales o la médula espinal (Fenger y Dutoit 2003).

Se describen a continuación las características en las células cancerosas que las distinguen de las normales (Hanahan y Weinberg 2011):

1) Sustento de señalización proliferativa

El mayor rasgo fundamental de las células de cáncer es su habilidad de sostener una proliferación crónica. Los tejidos normales controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento, que dan instrucciones para entrar y progresar a través del ciclo celular, garantizando así, una homeostasis en el número de células y el mantenimiento de la arquitectura y función como tejido normal (Hanahan y Weinberg 2011).

2) Evasión de supresores del crecimiento

Además de la capacidad distintiva de inducir y sostener activamente señales estimuladoras de crecimiento, las células de cáncer deben sortear poderosos programas que regulan negativamente la proliferación celular; algunos de estos programas dependen de la acción de genes supresores de tumor. Docenas de moléculas supresoras de tumor que operan en distintas vías, para limitar el crecimiento y proliferación celular, han sido descubiertas a través de sus características de inactivación, ya sea en cáncer de animales o humano; algunos de estos genes han sido identificados como supresores de tumor, por medio de la ganancia o pérdida de función en diversos

estudios en modelos murinos. Los dos supresores tumorales prototípicos, codifican el ARB (Asociado a retinoblastoma) y TP53, que operan como nodos centrales de control, dentro de dos circuitos reguladores celulares complementarios clave, que gobiernan las decisiones de las células de proliferar o alternatively activar programas de senescencia y apoptosis (Hanahan y Weinberg 2011).

3) Resistencia a la muerte celular

El concepto de muerte celular programada por apoptosis sirve como una barrera natural para el desarrollo del cáncer, se ha establecido por convincentes estudios funcionales durante las últimas dos décadas.

Las células tumorales desarrollan una variedad de estrategias para limitar o eludir la apoptosis. La más común es la pérdida de función del supresor tumoral TP53, que elimina este sensor de daño crítico del circuito de apoptosis. Alternativamente, los tumores pueden lograr fines similares al aumentar la expresión de reguladores antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) o de señales de supervivencia (Igf1/ 2), mediante regulación negativa de factores proapoptóticos (Bax, Bim, Puma) o por un cortocircuito de la vía de muerte inducida por ligando extrínseco (Hanahan y Weinberg 2011).

4) Habilitar la inmortalidad replicativa

Para el año 2000, se aceptaba ampliamente que las células cancerosas requieren un número ilimitado de potencial replicativo para generar tumores macroscópicos. Esta capacidad, está en contraste con el comportamiento de las células en la mayoría de los linajes celulares normales en el cuerpo, que son capaces de atravesar solo un número limitado de ciclos de crecimiento y división. Esta limitación, ha sido asociada con dos barreras distintas a la proliferación: la senescencia, una entrada irreversible en un estado no proliferativo pero viable, y crisis, que implica la muerte celular. En raras ocasiones, las células emergen de una población en crisis y exhiben réplicas ilimitadas. Esta transición ha sido llamada inmortalización, un rasgo que la mayoría de las líneas celulares establecidas poseen, en virtud de su capacidad de proliferar en cultivo sin evidencia de senescencia o crisis (Hanahan y Weinberg 2011).

La telomerasa, la ADN polimerasa especializada que agrega telómeros, está casi ausente en las células no immortalizadas, pero se expresa en niveles significativos, en su mayoría de forma espontánea, en células immortalizadas, incluidas las células cancerosas humanas. La eventual immortalización de células se ha atribuido a su capacidad para mantener el ADN telomérico lo suficiente como para evitar el desencadenamiento de la senescencia o apoptosis, que se logra con mayor frecuencia, mediante la expresión regulada de la telomerasa o con menos frecuencia, a través de un mecanismo alternativo de mantenimiento de telómeros basado en la recombinación (Hanahan y Weinberg 2011).

5) Inducir angiogénesis

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren sustento en forma de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de evacuar los desechos del metabolismo y dióxido de carbono. La neovasculatura asociada al tumor, generada por el proceso de la angiogénesis, aborda estos necesariamente (Hanahan y Weinberg 2011).

Durante la progresión del tumor, un "interruptor angiogénico" casi siempre está activado y permanece encendido, causando una vasculatura normalmente activa, continuamente brotan nuevos vasos que ayudan a mantener la expansión de crecimientos neoplásicos.

Los inductores e inhibidores de la angiogénesis más conocidos son: el factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A) y trombospondina- 1 (TSP-1), respectivamente (Hanahan y Weinberg 2011).

6) Invasión y metástasis

El proceso de invasión y metástasis ha sido esquematizado como una secuencia de pasos discretos, a menudo denominado cascada de invasión- metástasis. Esta descripción visualiza una sucesión de cambios en las células, comenzando con la invasión local, luego intravasación por células cancerígenas en vasos sanguíneos y linfáticos cercanos, tránsito de células cancerosas a través de los sistemas linfático y hematógeno, seguido por el escape de las células cancerosas del lumen de tales vasos en el parénquima de tejidos distantes (extravasación), la formación de pequeños

nódulos de células cancerígenas (micrometástasis), y finalmente el crecimiento de lesiones micrometastásicas en tumores macroscópicos, este último paso se denomina "colonización" (Hanahan y Weinberg 2011).

7) Reprogramando el metabolismo energético

La proliferación celular crónica y a menudo descontrolada que representa la esencia de la enfermedad neoplásica, involucra no solo la desregulación de la proliferación celular, sino también ajustes correspondientes del metabolismo energético para impulsar el crecimiento celular y división. En condiciones aeróbicas, el proceso de degradación de la glucosa en células normales, primero se produce piruvato a través de la glucólisis en el citosol y posteriormente a dióxido de carbono en las mitocondrias; bajo condiciones anaeróbicas, se favorece la glucólisis y relativamente poco piruvato es enviado a las mitocondrias que consumen oxígeno. En presencia de oxígeno, las células cancerosas pueden reprogramar el metabolismo de la glucosa, y por lo tanto su producción de energía, limitando su metabolismo energético en gran parte a la glucólisis, lo que lleva a un estado que se ha denominado "glucólisis aeróbica" (Hanahan y Weinberg, 2011).

8) Evasión del sistema inmune

En años recientes, se sugiere que el sistema inmune funciona como una barrera importante para la formación y progresión del tumor. Las células cancerosas bien pueden evadir al sistema inmune al deshabilitar algunos de sus componentes como, por ejemplo, pueden paralizar la infiltración de CTL y células NK, al secretar TGF- β u otro factor inmunosupresor.

Mecanismos que operan a través del reclutamiento de células inflamatorias que son activamente inmunosupresoras, incluídas las células T reguladoras (Tregs) y las células supresoras derivadas mieloides (MDSCs). Ambos pueden suprimir las acciones de los linfocitos citotóxicos (Hanahan y Weinberg 2011).

Estadística

En el norte de México la mortalidad causada por cáncer ha ido en aumento desde 1990 al 2013, mientras que en el sur del país este dato ha ido disminuyendo (Figura 1-Tabla 1), entre los cánceres más comunes en México se encuentran el de mama, cervical, próstata, colon, algunos tipos de linfoma, etc. Los datos muestran una tendencia decreciente para algunos cánceres (pulmón y cervical), mientras otros aparecen como prioritarios y relevantes (próstata, mama, estómago, colon e hígado) (Gómez-Dantés et al. 2016)

Cancer	Incident cases (thousands)			ASIR, both sexes (per 100 000)	Deaths (thousands)			ASDR, both sexes (per 100 000)
	Total	Male	Female		Total	Male	Female	
All except NMSC and KS	195 925	37 412	43 281	206.9	84 172	15 511	16 319	94.8
Esophageal	1 601	1 072	529	1.9	1 560	1 061	499	1.9
Stomach	11 779	6 670	5 108	13.5	8 364	4 695	3 669	9.8
Liver	5 903	2 852	3 051	6.9	6 594	3 127	3 467	7.8
Larynx	2 204	1 887	317	2.5	1 098	902	195	1.3
Tracheal, bronchus and lung	9 277	6 154	3 123	10.9	8 687	5 672	3 016	10.3
Breast	23 873	186	23 687	23.6	5 902	50	5 853	6.2
Cervical	12 562	–	12 562	12.0	5 842	–	5 842	6.2
Uterine	3 027	–	3 027	3.1	606	–	606	0.7
Prostate	29 428	29 428	–	35.5	6 520	6 520	–	8.3
Colon and rectum	13 010	6 517	6 493	14.6	6 255	3 163	3 092	7.2
Lip and oral cavity	2 568	1 504	1 064	2.9	914	580	334	1.1
Nasopharynx	184	126	57	0.2	138	90	48	0.1
Other pharynx	533	446	87	0.6	281	225	56	0.3
Gallbladder and biliary tract	2 742	957	1 785	3.2	2 011	608	1 403	2.4
Pancreatic	4 700	2 183	2 518	5.4	4 516	2 115	2 401	5.3
Malignant skin melanoma	2 201	1 042	1 158	2.3	602	326	276	0.7
Ovarian	3 791	–	3 791	3.7	2 336	–	2 336	2.5
Testicular	3 446	3 446	–	2.7	427	427	–	0.4
Kidney	5 219	3 062	2 156	5.6	2 351	1 427	924	2.6

Tabla 1. Análisis de las tendencias de incidencia y muerte, a nivel nacional, para ambos géneros. México desde 1990 al 2013. ASDR: Tasa de muerte por edad; ASIR: Incidencia estandarizada por edad; ICD-9: Clasificación internacional de enfermedades, novena revisión; ICD-10: Clasificación estadística internacional de enfermedades y problemas relacionados a la salud, decima revisión; NMSC: Cáncer de piel, no melanoma; YLDs: Años vividos con discapacidad; YLLs: Años de vida perdidos (Gómez-Dantés et al. 2016) .

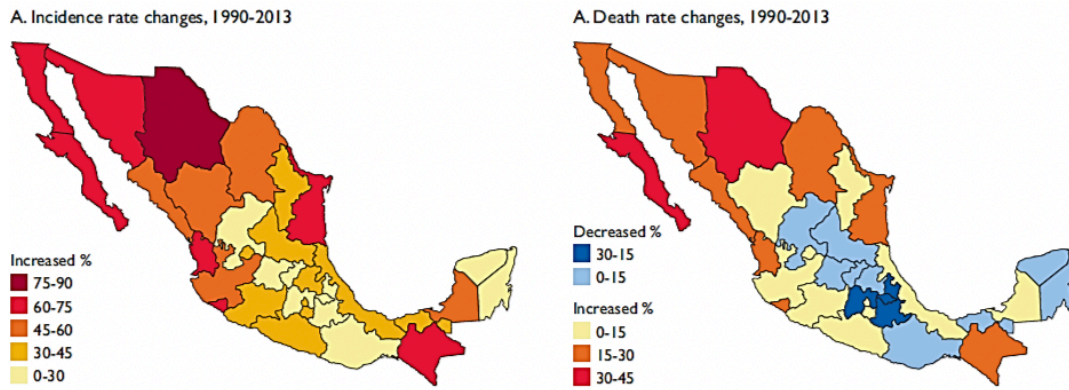


Figura 1. Porcentaje de incidencia y muertes por edad, en ambos géneros, para todos los tipos de cáncer. México desde 1990 al 2013 (Gómez-Dantés et al., 2016).

2.4 Tipos de cáncer en sistema nervioso

Las neoplasias del SNC incluyen no solo las que se originan en el encefalo, medulaespinal o meninges, sino tambien tumores metastasicos procedentes de otros sitios. Las neoplasias primarias del SNC son algo diferentes de las neoplasias originadas en otros sitios en el sentido de que incluso lesiones histologicamente benignas pueden producir la muerte a causa de la compresión de estructuras vitales. El análisis de los tumores primarios del SNC se enfoca sobre los tumores neurogliales más comunes (astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas), tumores neurectodérmicos primitivos (TNEP) y meningiomas (Kumar et al., 1997)

Glioma

El glioma maligno corresponde a uno de los tumores de cerebro con mayor prevalencia, constituyen aproximadamente el 50% de todos los cánceres en el sistema nervioso central. El glioblastoma multiforme es el subtipo más letal en donde la sobrevivencia media de los pacientes es de 8- 12 meses desde su diagnóstico (Barciszewska et al., 2015).

Los astrocitomas representan el grupo mas común de tumores primarios del SNC. Comprenden un grupo heterogéneo de neoplasias que varían desde lesiones circunscritas de crecimiento lento, cuyo prototipo es el astrocitoma pilocítico, hasta

neoplasias infiltrantes muy malignas como el glioblastoma multiforme. Los tumores astrocíticos se clasifican en neoplasias astrocíticas fibrilares (infiltrantes) y astrocitomas pilocíticos (Cotran et al., 1999).

Las neoplasias astrocíticas fibrilares, a veces llamadas astrocitomas difuso, se caracterizan por un patrón de crecimiento infiltrativo. Aunque se encuentran más a menudo en los adultos, pueden presentarse en cualquier edad. Los tumores de este tipo aparecen con mayor frecuencia en los hemisferios cerebrales, pero pueden observarse en cualquier parte del neuroeje. Los astrocitomas se subdividen en grados histológicos, para determinar un pronóstico de la conducta biológica del tumor. Un esquema de empleo común es el sistema de tres filas que divide estos tumores en tres grados: lesiones bien diferenciadas, designadas astrocitoma; tumores de grado intermedio, denominados astrocitoma anaplásico y lesiones más agresivas que se conocen como glioblastoma multiforme.

Los astrocitomas pilocíticos son más frecuentes en niños, aunque pueden ocurrir en cualquier edad. Los sitios comunes incluyen cerebelo, tercer ventrículo y nervios ópticos, pero igual que con los astrocitomas fibrilares cualquier parte del SNC puede afectarse. Suelen distinguirse de las neoplasias astrocíticas fibrilares por su naturaleza más discreta y conducta más indolente (Kumar et al., 1997).

Oligodendrogliomas

Los oligodendrogliomas son más comunes en la edad adulta y por lo general se encuentran en los hemisferios cerebrales (Cotran et al., 1999).

Ependimomas

Los ependimomas pueden ocurrir a cualquier edad. La mayor parte se origina en una de las cavidades ventriculares o en el área del conducto central de la médula espinal. Los ependimomas intracraneales son más comunes en los dos primeros decenios de la vida, en tanto que las lesiones intrarraquídeas predominan en adultos. Los ependimomas intracraneales aparecen con mayor frecuencia en el cuarto ventrículo, donde pueden obstruir el flujo externo del LCR y producir hidrocefalia e incrementar la presión intracraneal (Cotran et al., 1999).

Tumores neurectodérmicos primitivos

El término tumor neurectodérmico primitivo (TNEP) se refiere a un grupo de neoplasias compuestas de células embrionarias pequeñas (primitivas). Estas neoplasias pueden ser indiferenciadas o mostrar grados variables de diferenciación neurona, glial o incluso mesenquimatoso. Los TNEP que aparecen en el SNC incluyen meduloblastomas, neuroblastomas, pineoblastomas y ependimoblastomas (Cotran et al., 1999).

Los meduloblastomas son lesiones del cerebelo que predominan en los primeros dos decenios de la vida. El vermis cerebeloso es el sitio habitual de origen en niños de corta edad, pero en pacientes mayores casi siempre se originan en los hemisferios cerebelosos. Las lesiones obliteran la estructura normal del cerebelo y pueden prolongarse al interior del sistema ventricular, donde a veces simulan ependimomas. Como los ependimomas, los meduloblastomas pueden diseminarse a través del LCR y encerrar el neuroeje en un depósito metastásico semejante a una vaina (Cotran et al., 1999).

El neuroblastoma es uno de los tumores sólidos extracraneales más comunes de la infancia. La mayor parte (80-90%) se observa en niños menores de cinco años, muchos en el primer año de vida. Su origen se encuentra en la cresta neural, pero los neuroblastomas pueden originarse en cualquier otra parte del sistema nervioso simpático, desde la cabeza hasta la pelvis. Casi 75 % se origina dentro del abdomen: cerca de la mitad en las glándulas suprarrenales y la otra mitad en ganglios autónomos abdominales paravertebrales (Cotran et al., 1999).

Meningiomas y otras neoplasias meníngicas

Los meningiomas son tumores derivados de las células meningoteliales que revisten la sustancia aracnoidea. Por consiguiente la mayor parte de estas lesiones aparece fuera del parénquima cerebral. Por lo general los meningiomas ocurren en adultos y pueden originarse en la bóveda craneal y en la médula espinal. Como muchas otras masas intracraneales en expansión, los meningiomas intracraneales presentan evidencia de incremento de la presión intracraneal que puede acompañarse de convulsiones y deficiencias neurológicas focales (Cotran et al., 1999).

Neoplasias metastásicas

El cerebro es un sitio común de lesiones metastásicas. Estas se presentan de manera predominante en el anciano y son paralelas al incremento de tumores viscerales sólidos conforme la edad aumenta. Sin embargo, las neoplasias hematopoyéticas como los linfomas y las leucemias, que se presentan tanto en niños como en adultos, pueden producir metástasis al SNC. Las neoplasias metastásicas pueden afectar las meninges y el parénquima cerebral. Con exclusión de las leucemias y los linfomas, los sitios primarios más comunes, en orden descendente de frecuencia son carcinomas de pulmón, mamas y melanomas malignos (Cotran et al., 1999).

2.5 Tratamiento convencionales para el cáncer de SNC

Para el tratamiento del glioma se recurre al empleo de la cirugía, radioterapia y quimioterapia, de esta última, los fármacos de primera línea son el carboplatino aplicado en conjunto con la vincristina, además de un tratamiento con el ácido 5-aminolevulínico; si hay recurrencia del tumor al ser escindido o eliminado con cualquier método anteriormente mencionado, se aplica una quimioterapia con el fármaco temozolomida, administrado por vía oral (Alegría-Loyola, Galnares-Olalde, and Mercado 2017; Ferro Sánchez 2016) .

2.6 Muerte inmunogénica (ICD)

La inmunogenicidad depende de dos factores clave: antigenicidad y capacidad adyuvante. La presencia de antígenos exógenos o mutados explica por qué las células infectadas y las células malignas pueden iniciar una respuesta inmune adaptativa, siempre que las células también emitan señales adyuvantes como consecuencia del estrés celular y la muerte. Varios patógenos infecciosos han ideado estrategias para controlar la muerte celular y limitar la emisión de señales de peligro de las células moribundas, evitando así el reconocimiento inmunológico. De manera similar, las células cancerosas a menudo escapan de la vigilancia inmunológica debido a defectos en la maquinaria molecular que subyace a la liberación de adyuvantes endógenos (Galluzzi, 2016).

Los receptores de reconocimiento de patrón se activan por su interacción con patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Los DAMP producidos por las células moribundas pueden actuar como adyuvantes y comunicar un estado de peligro al organismo. Sin embargo, estos DAMP son incapaces de iniciar una respuesta inmune adaptativa a menos que las células moribundas muestren un aumento de la antigenicidad, es decir, poseen epítomos antigénicos que no han obtenido previamente tolerancia central o periférica (Tabla1)(Galluzzi, 2016).

Señal de peligro	PRR	Función
ANXA1	FPR1	Guía el aproximamiento final de las APCs a las células en proceso de muerte.
ATP	P2RX1 P2RY2	Favorece el reclutamiento de APCs y su activación.
CALR	LRP1	Promueve la captación de antígenos asociados a muerte celular.
RNA celular	TLR3	Promueve la síntesis de factores pro-inflamatorios incluyendo IFNs de tipo 1.
CpG DNA	TLR9	Promueve la síntesis de factores pro-inflamatorios incluyendo IFNs de tipo 1.
CXCL10	CXCR3	Estímula el reclutamiento de células T.
PDIA3	?	Promueve la captación de antígenos asociados a muerte celular.
HMGB1	AGER TLR2 TLR4	Promueve la síntesis de factores pro-inflamatorios incluyendo IFNs de tipo 1.
HSP70	LRP1	Promueve la captación de antígenos asociados a muerte celular.
HSP90	LRP1	Promueve la captación de antígenos asociados a muerte celular.
IFN tipo 1	IFNAR	Promueve la secreción de CXCL10 en las células y ejerce efectos inmunoestimulatorios.

Tabla 2. Señales de peligro en la muerte inmunogénica

2.6.1 Formas de ICD

Durante mucho tiempo, la muerte celular ha sido clasificada de manera engañosa de una manera dicotómica. Por lo tanto, aunque la apoptosis (definida sobre la base de las características morfológicas) se consideró un ejemplo fisiológico, regulado y no inmunogénico (o incluso tolerogénico) de la muerte celular, la necrosis (también asociada con rasgos morfológicos específicos) se consideró una variante patológica, incontrolable e inmunogénica de muerte celular. Las células pueden sucumbir a la activación de una maquinaria molecular codificada genéticamente (es decir, de manera regulada) mientras exhiben un morfotipo necrótico; las formas reguladas de necrosis participan en el desarrollo y la homeostasis del tejido, y las células apoptóticas pueden desencadenar una respuesta inmune específica de antígeno. Una de las consecuencias de esta revolución conceptual es que el enfoque estándar para determinar si la muerte celular puede ser inmunogénica ya no implica evaluaciones morfológicas o bioquímicas de células moribundas, sino que se basa en experimentos de vacunación en los que se inyectan células moribundas murinas en ratones singénicos inmunocompetentes. Hasta ahora no se han descubierto más de cuatro tipos de ICD,

cada uno de los cuales se basa en la emisión y detección de un panel específico de DAMP (Figura 1)(Galluzi,2016).

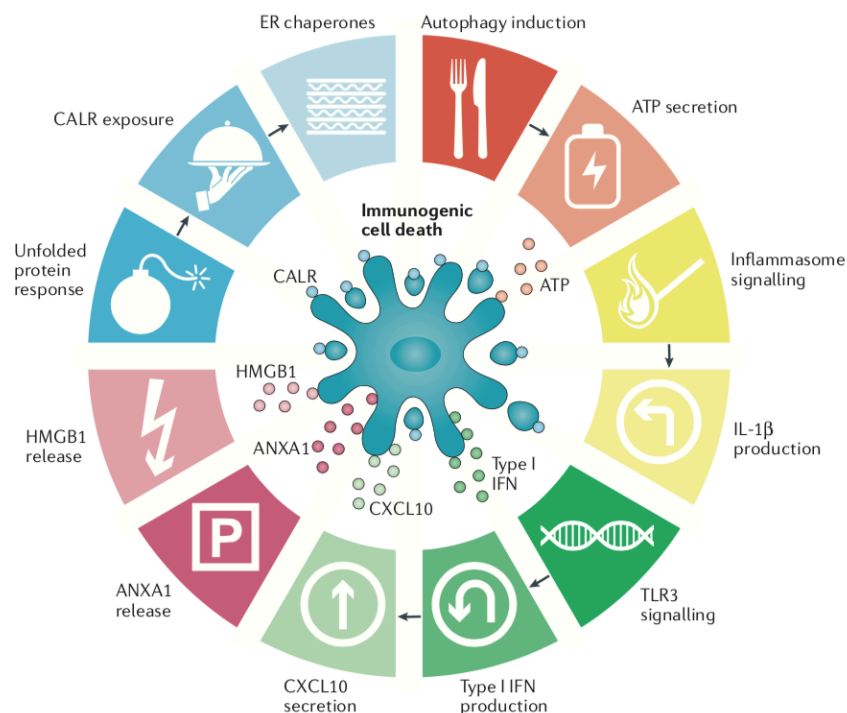


Figura 2. Requerimientos diferenciales para la inmunogenicidad de la muerte celular. Varios procesos han sido vinculados a la inmunogenicidad de la muerte celular, incluida la respuesta de la proteína desplegada y la consiguiente exposición de calreticulina (CALR) y otras chaperonas del retículo endoplásmico (ER) en la superficie celular; la activación de la autofagia y la consiguiente secreción de ATP; la liberación de interleucina-1 β (IL-1 β) en la señalización del inflammasoma; la activación del receptor tipo Toll 3 (TLR3), que resulta en una respuesta de interferón de tipo I (IFN) que estimula la producción de ligando de quimiocina CXC 10 (CXCL10); así como el lanzamiento del high mobility group box 1 (HMGB1) y anexina A1 (AXA1).

2.6.2 ICD inducida por la quimioterapia.

Las células cancerosas de ratones expuestas a algunos quimioterapéuticos que se usan actualmente en la clínica, como la doxorubicina, la mitoxantrona, el oxaliplatino y el bortezomib, se someten a una ICD auténtica, como lo demuestran los experimentos de vacunación en ratones. En ratones, la ICD por quimioterapia se basa en el eIF2A, la exposición dependiente de la fosforilación del retículo endoplásmico (ER), chaperonas como calreticulina (CALR), proteína disulfuro isomerasa miembro de la familia A 3 (PDIA3; también conocida como ERp57), proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70;

también conocida como HSPA1A) y la proteína de choque térmico 90 kDa (HSP90; también conocida como HSP90AA1) en la membrana plasmática de las células cancerosas moribundas. Además, implica la secreción mediada por autofagia de ATP36, la activación de una respuesta de IFN tipo I intrínseca de células cancerosas y la consiguiente secreción del ligando de quimiocina CXC 10 (CXCL10), así como la liberación del high mobility group box (HMGB1) y anexina A1 (ANXA1) (Figura 2) . Estas manifestaciones de ICD también se han observado en células cancerosas humanas que sucumben a la quimioterapia inmunogénica; aunque las células humanas no pueden caracterizarse en ensayos de vacunación (Galluzzi, 2016).

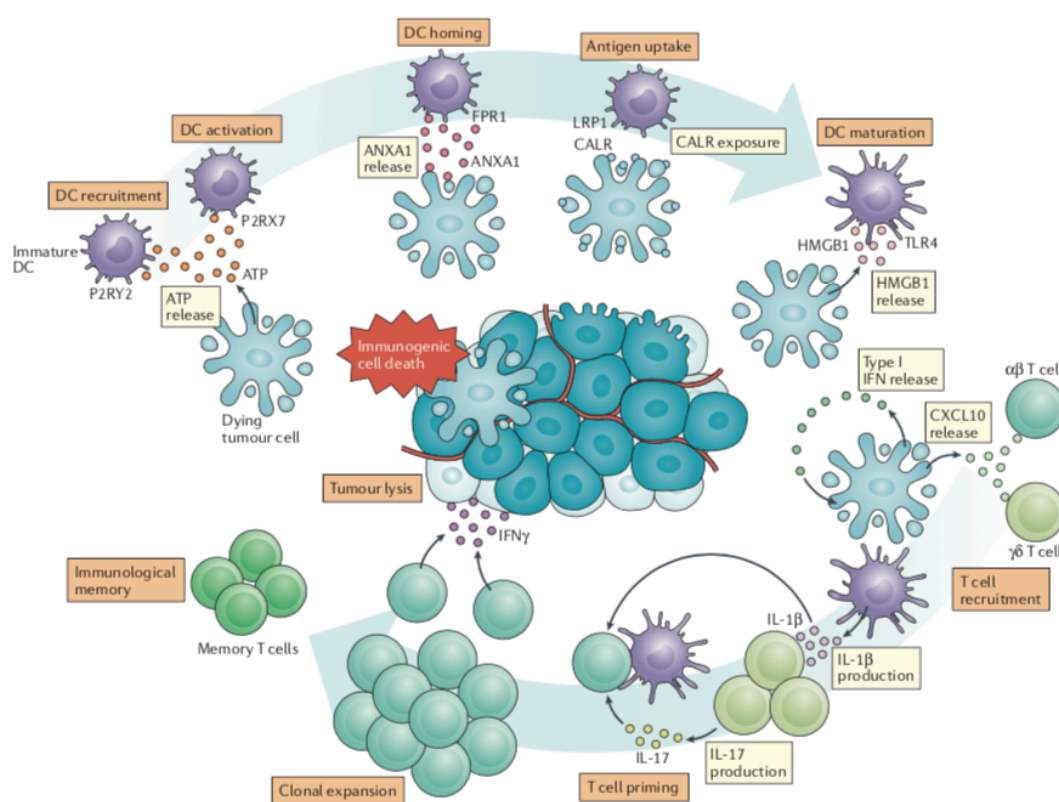


Figura 3. Mecanismos de ICD inducido por quimioterapia. En respuesta a inductores de muerte celular inmunogénica, como la doxorubicina u oxaliplatino, las células malignas exponen calreticulina (CALR) y otras chaperonas del retículo endoplásmico en su superficie, secretan ATP, inician una respuesta de interferón de células intrínsecas tipo I (IFN). en la producción de quimiocinas ligando CXC 10 (CXCL10), y libere el high mobility group box 1 (HMGB1) y la anexina A1 (ANXA1). Al unirse a receptores afines en la superficie de las células mieloides o linfoides, estos patrones moleculares asociados al daño favorecen la captación de los restos celulares por parte de las células presentadoras de antígenos, incluidas las células dendríticas (DC) en el contexto de señales inmunoestimuladoras,

eventualmente que conduce al cebado de una respuesta inmune adaptativa que involucra tanto células T $\alpha\beta$ como $\gamma\delta$, además de estar asociada con el establecimiento de la memoria inmunológica, esta respuesta tiene el potencial de erradicar las células malignas que sobreviven a la quimioterapia a través de un mecanismo dependiente de $\text{IFN}\gamma$. CXCR3, CXC - receptor de quimioquinas 3; FPR1, receptor 1 del péptido formilo; IFNAR1; interferón α / β -receptor de la subunidad 1; IL, interleucina; LRP1, proteína 1 relacionada con el receptor de LDL; P2RX7, receptor purinérgico P2X7; P2RY2, receptor purinérgico P2Y2; TLR4, receptor tipo Toll 4.

2.6 Temozolomida

La temozolomida es un agente alquilante, usualmente administrado mediante la vía oral, se utiliza para el tratamiento de astrocitomas anaplásicos refractarios, es un compuesto lipofílico, por lo que cruza la barrera hematoencefálica (BBB) de forma eficiente y se encuentra disponible para el SNC (Magaña-Maldonado et al. 2016) .

El principal mecanismo responsable de la citotoxicidad causada por temozolomida es la metilación de DNA. Por una reacción espontánea y dependiente de pH, la temozolomida se convierte en MTIC (agente alquilante activo). Seguidamente, MTIC (5-(3-methyltriazene-1-yl)imidazole-4-carboxamide) se degrada, formando el catión metil-diazonio, el cual es responsable de transferir el grupo metilo al DNA. De esta manera, se producirá el producto final, el AIC que se excreta por vía renal (Ferro Sánchez 2016) .

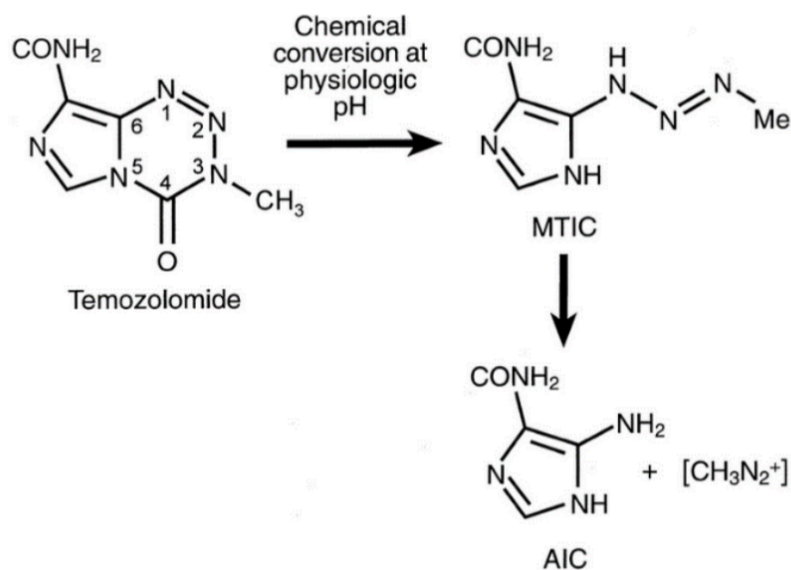


Figura 4. Reacción química de conversión de la temozolomida a AIC. La reacción se lleva a cabo en dos fases: en la primera, se produce MTIC como consecuencia de la acción del agua sobre el carbono 4 (C4) de la temozolomida, el cual es altamente electropositivo. Esto produce la ruptura del anillo y la liberación de CO₂. En la segunda etapa, el MTIC recién formado, se transforma a AIC (5-aminoimidazola-4- carboxiamida) al transferirse un metilo al DNA (Ferro Sánchez 2016) .

2.7 Panobinostat

El panobibostat es una pequeña molécula, la cual inhibe a las histonas deacetilasas (HDACs) de clase I, II y IV, este fármaco epigenético fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento del mieloma multiple. El panobinostat ha mostrado tener efectos antitumorales y antiangiogénicos en el glioma, se han empleado estudios clínicos de fase I y II donde utilizan este agente en combinación con bevacizumab en pacientes con glioblastoma multiforme recurrente (Moore, 2016).

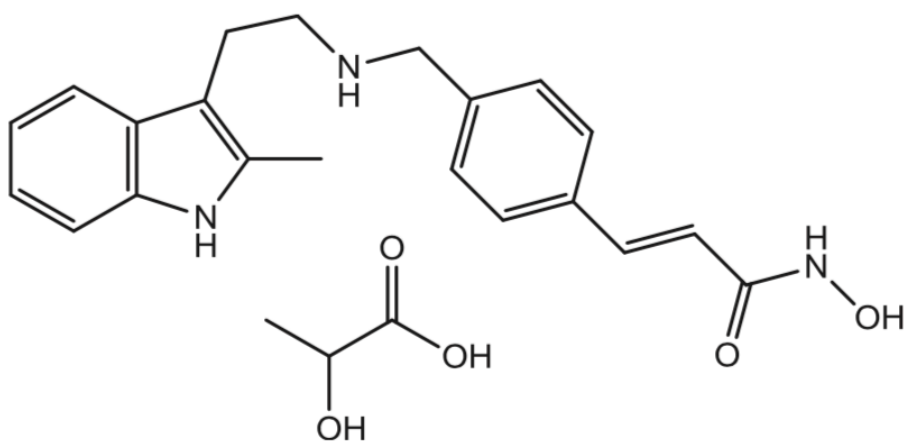


Figura 5. Estructura química del panobinostat (Moore P. 2016)

2.8 *Lophophora williamsii* (peyote)

Lophophora williamsii es un cactus pequeño, sin espinas, color verde-azulado y con sabor astringente, utilizado desde hace mucho tiempo por tribus indígenas de México como los huicholes, los cora y los tarahumaras para diversos rituales (Rose 2016; Ferro Sánchez 2016) . Se encuentra en la naturaleza, en las entidades federativas de Nayarit, Nuevo León, Tamaulipas, Sonora, Coahuila, Chihuahua y en Estados Unidos en el estado de Texas a lo largo del Río Grande (Franco-Molina et al., 2003).

Este cactus tiene propiedades alucinógenas debido a la mescalina, produciendo además hambre, sed y somnolencia. En el cáncer se le ha observado efecto citotóxico en distintas líneas celulares de diferente origen como la MCF7 y L5178Y-R entre otras (Franco-Molina et al., 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

El glioma es una neoplasia originada en el sistema nervioso central con gran incidencia a nivel mundial 10.82 por cada 100,000 personas al año, siendo más frecuente en niños (1.29/100,000) y adultos mayores (11.36/100,000). Los tratamientos utilizados hoy en día (cirugía, radioterapia y quimioterapia) no son eficaces, ya que ofrecen hasta 21.25 meses de sobrevivencia. Por ello se propone el uso de la temozolomida, panobinostat y el extracto de *L. williamsii* para incrementar su efectividad antitumoral y evaluar su capacidad de inducir muerte inmunogénica en un modelo de glioma en ratas.

4. HIPÓTESIS

El tratamiento con temozolomida, panobinostat y el extracto de *Lophophora williamsii* incrementa su efecto antitumoral e inducen muerte inmunogénica en un modelo de glioma murino.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la terapia con temozolomida, panobinostat y el extracto de *Lophophora williamsii* incrementa su actividad antitumoral e induce muerte inmunogénica en un modelo de glioma en ratas.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Evaluar el efecto *in vitro* de los tratamientos con temozolomida, panobinostat y el extracto metanólico de *L. williamsii* en la línea celular C6.
- II. Valorar si los tratamientos con temozolomida, panobinostat y el extracto metanólico de *L. williamsii* inducen liberación de DAMPs en la línea celular C6.
- III. Determinar si las células C6 tratadas con temozolomida, panobinostat y el extracto metanólico de *L. williamsii* inducen muerte inmunogénica.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Mantenimiento de la línea celular

La línea celular de glioma murino C6 se obtuvo del American Type Tissue Collection y se mantuvo en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina. La línea celular se incubó en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ a 37 °C.

Para conservar la línea celular, las células (3-4 millones) se congelaron con medio de congelación (DMEM, 20% [v/v] y 100 µL de DMSO por cada mililitro de solución) en un criotubo a una temperatura de -20 °C durante 2 h, posteriormente se colocó el criotubo con las células C6 a una temperatura de -80 °C.

7.2 Reactivos y anticuerpos

La temozolomida se obtuvo de Schering-Plough Corporation (Kenilworth, NJ). *Lophophora williamsii* se obtuvo de la colección de extractos del departamento de inmunología que describe que su colección fue hecha para la realización de estudios de citotoxicidad celular (Franco Molina, 2003). El panobinostat fue comprado de Cellagen Technology (San Diego, CA). Los anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos a HSP70 (cat. No. Sc-32239), HMGB1 (cat. No. Sc-56698), HSP90 (cat. No. Sc-13119) y anticuerpos secundarios anti-ratón de cabra (cat. No. Sc -516102). Las IgG conjugadas con peroxidasa de rábano se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX).

7.3 Animales

Se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos, con un peso entre 200-300 g, se mantuvieron y manejaron con base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 respecto a: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Además se contó con la aprobación del Comité de Ética y Bienestar Animal del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León.

7.4 Efecto de la temozolomida, panobinostat y extracto de *Lophophora williamsii* sobre la viabilidad de las células C6

Se sembraron las células C6 (5×10^3) en placas de 96 pocillos y se cultivaron 24 h en una incubadora con CO₂ al 5% a una temperatura de 37 °C. Las células fueron tratadas con TMZ (0-43 mM), LW (0-4.8 mg / mL) durante 24 y 48h , PAN (0-25 μM) durante 24, 48 y 72 h o en combinación. Posteriormente, las células se lavaron con PBS (1% v/v), se añadieron 100 μL de resazurina (20% v/v) a los pocillos y se incubaron durante 30 minutos en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37 ° C. La fluorescencia se midió mediante un lector de placas Synergy HTTM BioTek Instruments, Inc. a una longitud de onda de excitación de 535 nm y emisión de 590 nm.

7.5 Prueba de sensibilización a drogas

Las células se sensibilizaron con distintas concentraciones de TMZ (0-43 mM) durante 24h en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C, posteriormente se añadieron los tratamientos LW y PAN (1.92 mg/mL y 20 μM respectivamente) correspondientes a las DL50 encontradas a las 24h. Este mismo procedimiento se empleo usando los diferentes agentes como sensibilizantes y el posterior tratamiento con los demas agentes. Después, las células se lavaron con PBS (1% v/v), se añadieron 100 μL de resazurina (20% v/v) a los pocillos y se incubaron durante 30 minutos en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37 ° C. La fluorescencia se midió mediante un lector de placas Synergy HTTM BioTek Instruments, Inc. a una longitud de onda de excitación de 535 nm y emisión de 590 nm.

7.6 Prueba de recuperación

Se sembraron células C6 (5×10^3) en placas de 96 pozos, se cultivaron por 24 h en una atmósfera humidificada a 37 °C con 5% de CO₂. Las células se trataron con TMZ (0-43 mM), LW (0-4.8 mg/mL) durante 24 h, PAN (0-25 μM) durante 24 y 72 h.

Las células C6 se lavaron 2 veces con PBS (1% v/v) para retirar los tratamientos de los pocillos, se añadió medio DMEM (10% SFB) y posteriormente las células fueron incubadas durante 5 días con una atmósfera humidificada a 37 °C y 5% de CO₂.

Después de la incubación por 5 días, las células se lavaron con PBS (1% v/v), se añadieron 100 μ L de resazurina (20% v/v) a los pocillos y se incubaron durante 30 minutos en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37 ° C. La fluorescencia se midió mediante un lector de placas Synergy HTTM BioTek Instruments, Inc. a una longitud de onda de excitación de 535 nm y emisión de 590 nm. La viabilidad celular también fue evaluada mediante la técnica de bromuro de etidio y naranja de acridina.

7.7 Bromuro de etidio y naranja de acridina

Sobre cubreobjetos dentro de placas de 6 pozos, se sembraron células C6 (1×10^5) y se cultivaron por 24 h en una incubadora con atmósfera humidificada a 37 °C y con 5% de CO₂. Posteriormente las células se trataron con TMZ (8.6 y 43 mM) por 24h, LW (1.92 4.8 mg/mL) por 24h, PAN (0.5 y 25 μ M) por 72h. Además se integró el tratamiento combinado, en donde se sensibilizaron a las células con TMZ (17.2 mM) por 24h, para después tratar con las DL₅₀ combinadas de LW y PAN (1.92 mg/mL y 20 μ M respectivamente).

Posteriormente las células se lavaron con PBS (1% v/v), y se mantuvieron en el mismo PBS, se realizó una mezcla de naranja de acridina y bromuro de etidio (1:1) y se agregó al pocillo, posteriormente se observaron las células sobre el cubreobjetos con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Observer a una longitud de onda de excitación de 250 nm y una de emisión de 605 nm para observar el bromuro de etidio; por otro lado, para observar la tinción con naranja de acridina, las longitudes de onda de emisión y excitación fueron de 502 y 525 respectivamente. El tipo de muerte celular se determinó mediante la observación morfológica y coloración emitida (Liu et al., 2015). Una fluorescencia color verde indica viabilidad celular, una coloración anaranjada indica apoptosis y una coloración rojiza indica necrosis.

7.8 Inmunización con lisados celulares

Un total de 6×10^6 células C6 fueron tratadas *in vitro* con LW (4.8 mg / mL), TMZ (43 mM), PAN (25 μ M) o la combinación del pretratamiento con TMZ (16mM) durante 24 h + LW (2.4 mg / mL) y PAN (20 μ M) durante 24 h. Después de esto, las células se centrifugaron a 1, 200 RPM durante 10 minutos, se lavaron dos veces con PBS.

Posteriormente se sujetó la rata por el lomo, se inmovilizó el flanco izquierdo y se rasuró, finalmente, las células moribundas se resuspendieron en 300 µL de PBS y se inocularon por vía subcutánea en el flanco izquierdo de la rata.

Después de 7 días, las ratas se inocularon con 5×10^6 células C6 vivas resuspendidas en 300 µL de PBS por vía subcutánea en el flanco izquierdo. El crecimiento tumoral se midió 3 veces por semana en el sitio de la inyección durante 16 días mediante un vernier digital. Se realizó la medición del tumor por ancho (A) y largo (L), posteriormente se calculó el volumen tumoral con la ecuación: $A^2 \text{ (mm)} \times L \text{ (mm)} / 2$ (Rodríguez-Salazar et al., 2017).

7.9 Determinación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)

Las células C6 (5×10^6) fueron tratadas *in vitro* con LW (4.8 mg / mL), TMZ (43 mM), PAN (25 µM) o la combinación del pretratamiento con TMZ (16mM) durante 24 h + LW (2.4 mg / mL) y PAN (20 µM) durante 24 h. Posteriormente, las células se colectaron y centrifugaron a 1,200 RPM durante 10 min. Las células se lavaron con PBS y se homogenizaron con el buffer de lisis SET 2X (Tris a 20mM en un pH de 6.8, EDTA a 2 mM con un pH de 8.0, NaCl a 300 mM y SDS al 4 % p/v) suplementado con un coctél inhibidor de proteasas (Complete Halt). La cuantificación de proteína se realizó mediante el protocolo con BCA. Se utilizaron cantidades iguales de proteína (25 µg), posteriormente se realizó un ELISA indirecto para determinar la presencia de DAMPs (HMGB1, HSP70, HSP90).

Se trataron células C6 (5×10^5) con las DL_{50} encontradas a las 24h con TMZ (8.6 mM), LW (1.92 mg/mL), PAN (20 µM); además se empleó una sensibilización con TMZ (2.15 mM) por 24 y el tratamiento con LW y PAN (1.92 mg/mL y 20 µM respectivamente). Posteriormente, se colectó el sobrenadante de cada pozo, se centrifugó para eliminar cualquier residuo celular, y se llevó a cabo la cuantificación de proteína con el protocolo de BCA. Se colocó un máximo de 25 µg de proteína en la placa de 96 pocillos para realizar un ELISA indirecto para determinar liberación de DAMPs (HMGB1, HSP70, HSP90).

7.10 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado y el análisis estadístico se empleó mediante un análisis de varianza unidireccional y bidireccional, seguido de las pruebas de Dunnett y Tukey. Se consideró que $P < 0.05$ indicaba una diferencia estadísticamente significativa. Se utilizó GraphPad Prism versión 6 para realizar los análisis.

8. RESULTADOS

8.1 Efecto citotóxico de los tratamientos sobre la línea celular C6

Nuestros resultados muestran que el efecto citotóxico de la temozolomida es dependiente de dosis y tiempo (Figura 6), se determinó que la dosis letal media (DL₅₀) es de 8.6 μ M a las 24h. En la figura 7 se observa que el tratamiento con el extracto de *L. williamsii* reduce la viabilidad conforme a la dosis y al tiempo, se observa una DL₅₀ a la concentración de 1.92 mg/mL a las 24 h. Como se observa en la figura 8 el vehículo empleado para diluir el producto, no afectó la viabilidad celular en ninguna concentración empleada. El panobinostat no redujo la viabilidad de las células C6 a las 24 h, su efecto sobre la viabilidad celular se observó a partir de las 48 h (Figura 9).

Al combinar los diferentes tratamientos, empleando diferentes dosis DL₂₀, DL₃₀ y DL₅₀ por combinación de tratamiento, se observó que la viabilidad celular de las células no se afectó, como se observa en la figura 10.

Por otra parte, cuando se sensibilizó a las células con un pretratamiento con diferentes dosis de TMZ (0-43mM), y posteriormente se trató con panobinostat (DL₅₀) y extracto metánolico de *Lophophora williamsii* (DL₅₀) la viabilidad celular fue afectada significativamente de una manera dependiente de dosis ($p < 0.0001$) (Figura 11).

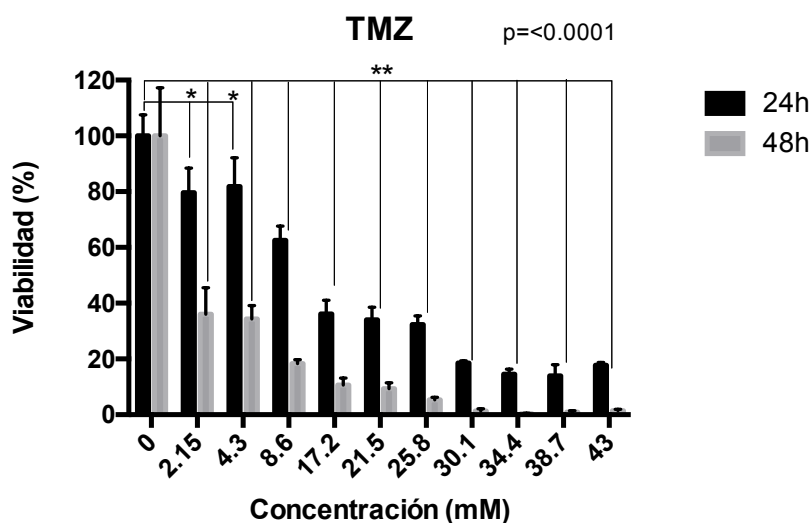


Figura 6. Efecto citotóxico de la temozolomida (TMZ) en la línea celular C6. 5,000 células C6 fueron tratadas con distintas concentraciones de TMZ (2.15-43 mM) durante 24h y 48h en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C, posteriormente se realizó la técnica de resazurina y se leyó la fluorescencia en un lector de placas (λ excitación y emisión a 530-590 nm). El gráfico respresenta el promedio de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

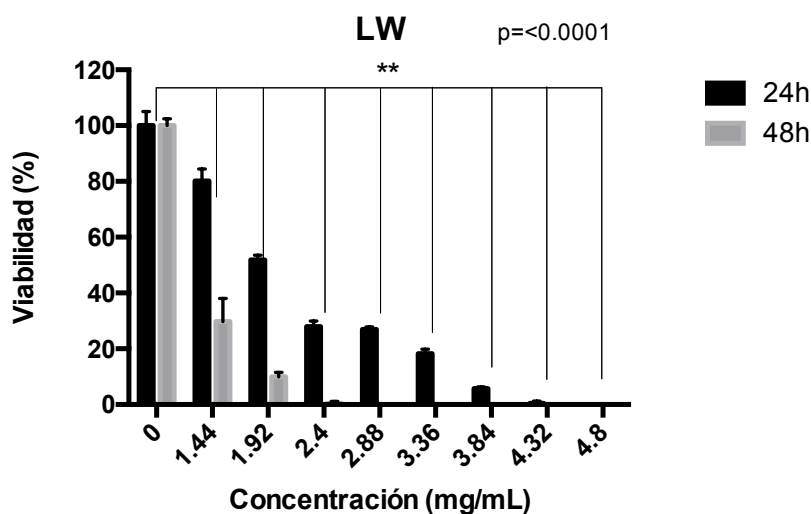


Figura 7. Efecto citotóxico del extracto de *Lophophora williamsii* (LW) en la línea celular C6. 5,000 células C6 fueron tratadas con distintas concentraciones de LW (0-4.8 mg/mL) durante 24h y 48h en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C, posteriormente se realizó la técnica de resazurina y se leyó la fluorescencia en un lector de placas (λ excitación y emisión a 530-590 nm). El gráfico respresenta el promedio de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

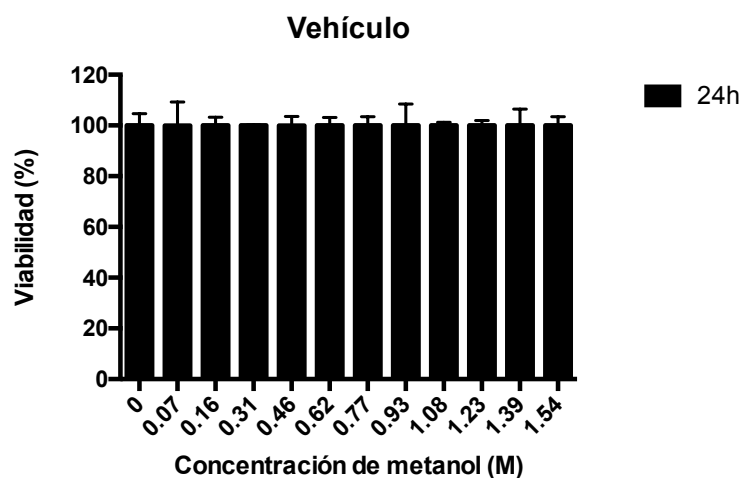


Figura 8. Efecto citotóxico del vehículo metanol (MET) en la línea celular C6. 5,000 células C6 fueron tratadas con distintas concentraciones de MET (0-1.54 M) durante 24h en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C, posteriormente se realizó la técnica de resazurina y se leyó la fluorescencia en un lector de placas (λ excitación y emisión a 530-590 nm). El gráfico respresenta el promedio de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

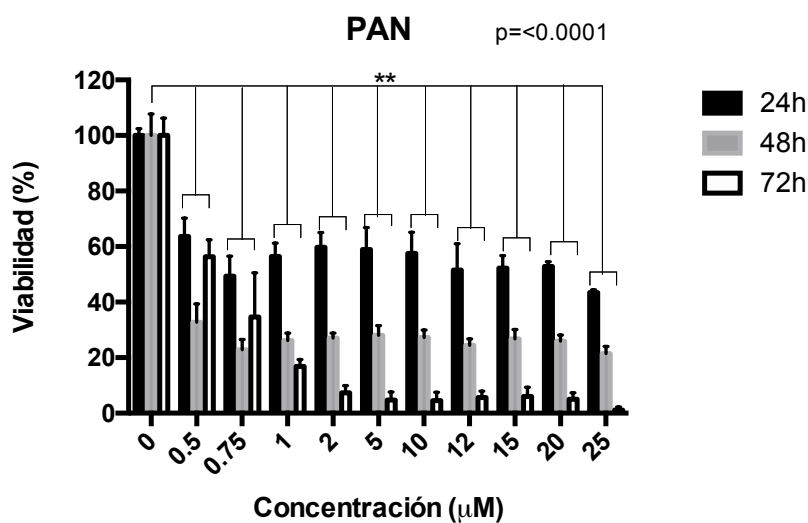


Figura 9. Efecto citotóxico del panobinostat (PAN) en la línea celular C6. 5,000 células C6 fueron tratadas con distintas concentraciones de PAN (0.5-25 μ M) durante 24h, 48h y 72h en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C, posteriormente se realizó la técnica de resazurina y se leyó la fluorescencia en un lector de placas (λ excitación y emisión a 530-590 nm). El gráfico respresenta el promedio de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

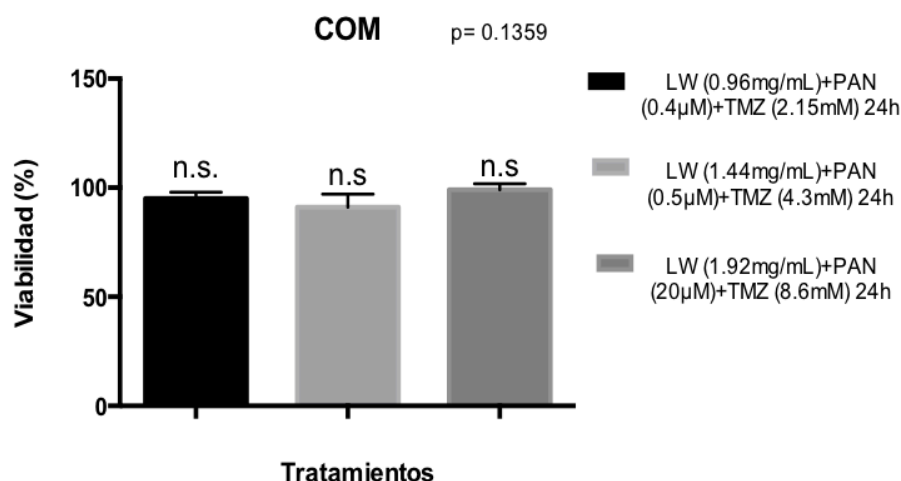


Figura 10. Efecto citotóxico de la temozolomida, el panobinostat y el extracto de *Lophophora williamsii* en la línea celular C6. 5,000 células C6 fueron tratadas con distintas concentraciones de TMZ, PAN y LW (DL20, DL30 y DL50 de cada tratamiento) durante 24h en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C, posteriormente se realizó la técnica de resazurina y se leyó la fluorescencia en un lector de placas (λ excitación y emisión a 530-590 nm). El gráfico respresenta el promedio de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

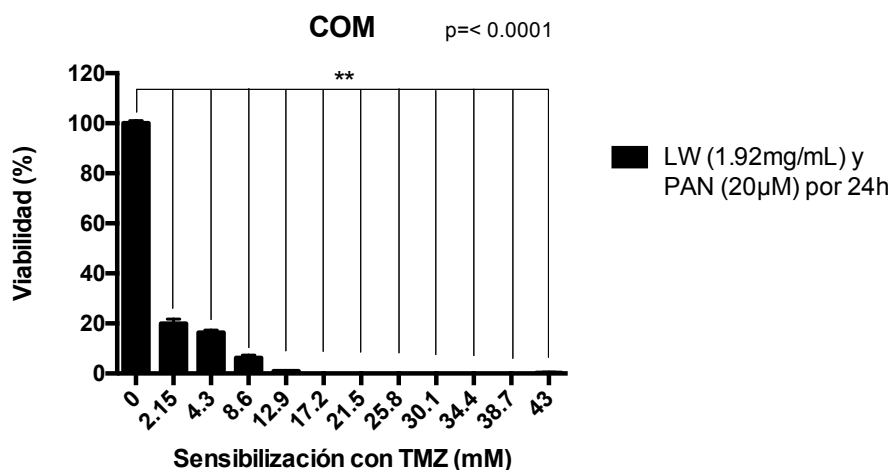


Figura 11. Efecto citotóxico de la temozolomida, el panobinostat y el extracto de *Lophophora williamsii* en la línea celular C6. 5,000 células C6 fueron pre-tratadas con distintas concentraciones de TMZ (0-43 mM) durante 24h en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C, posteriormente se retiró el pre-tratamiento y se añadieron los tratamientos LW y PAN (1.92 mg/mL y 20 μ M respectivamente) correspondientes a las DL50 encontradas a las 24h, se realizó la técnica de resazurina y se leyó la fluorescencia en un lector de placas (λ excitación y emisión a 530-590 nm). El gráfico respresenta el promedio de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

8.2 Tipo de muerte celular

Cuando las células C6 fueron tratadas con TMZ con una DL_{50} se observó un efecto una disminución de la viabilidad celular con pocas células en estado de necrosis y cuando se trató con la DL_{100} , el efecto de muerte celular por necrosis se incremento (Figura 12 B y C). El tratamiento con LW, con la DL_{50} disminuyó la proliferación celular pero cuando se trató con la DL_{100} se observó disminución de la viabilidad celular y muerte por apoptosis (Figura 12 D y E). Al tratar con PAN a las DL_{50} y DL_{100} se observó una disminución en la viabilidad celular, así como también procesos de muerte celular por apoptosis y necrosis (Figura 12 F y G). Por otro lado, al sensibilizar con TMZ (17.2 mM) por 24h y posteriormente tratar con las DL_{50} de PAN y LW, se observó una reducción significativa de la viabilidad, además de procesos de muerte apoptóticos y necróticos (Figura 12 H).

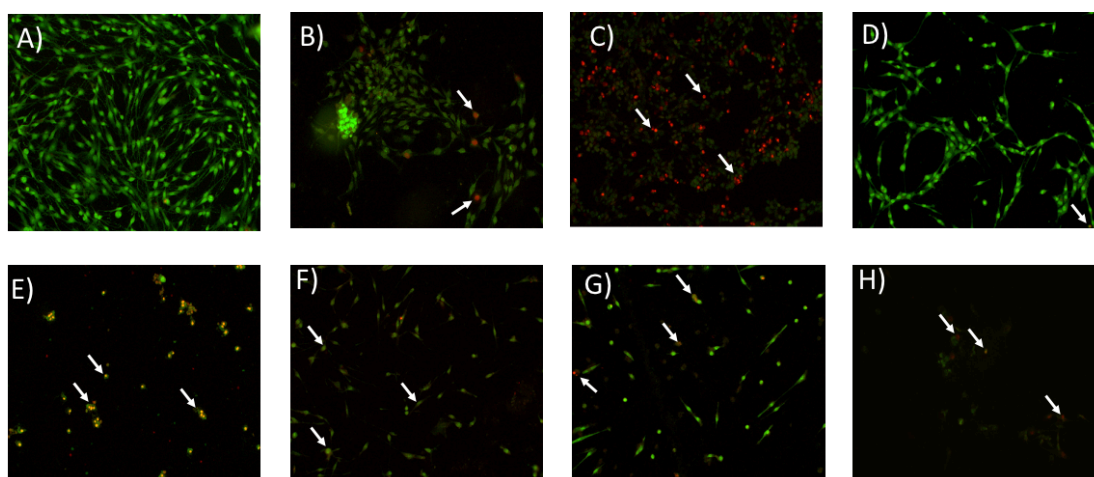


Figura 12. Micrografía. Citotoxicidad de los tratamientos sobre en la línea celular C6. 100,000 células C6 fueron cultivadas (A) y tratadas con distintas concentraciones de TMZ (B) 8.6 y (C) 43 mM por 24h, LW (D) 1.92 y (E) 4.8 mg/mL por 24h, PAN (F) 0.5 y (G) 25 μ M por 72h y (H) COM durante 24h en una atmósfera con 5% de CO_2 a 37°C, posteriormente se aplicó una tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio, se observaron las células en un microscopio de fluorescencia (20X). Nota: las células con tinción verde son viables, con coloración amarilla están en proceso de muerte apoptótico y las de color rojo están en fase de muerte celular tipo necrótico .

8.3 Tipo de muerte celular del ensayo de recuperacion

Las células C6 fueron tratadas con TMZ a una DL_{50} por 24h y se observó disminución del crecimiento celular, sugiriendo un tipo de muerte por apoptosis; al tratar con la DL_{100} se observó una disminución de la viabilidad celular con algunas células en estado de necrosis. Además, se determinó su efecto citotóxico mediante la prueba de proliferación celular (Figura 13 B y C). Por otro lado, el tratamiento con LW por 24h, con la DL_{50} disminuyó la proliferación celular con células en estado apoptótico y pocas células en estado necrótico; cuando se trató con la DL_{100} se observó disminución de la viabilidad celular y muerte por apoptosis, de igual manera se determinó el efecto citotóxico de LW ya que las células no recuperaron su viabilidad (Figura 13 D y E). Al tratar por 72h con PAN a las DL_{50} y DL_{100} se observó una disminución en proliferación celular con procesos de muerte celular por apoptosis, no se observó una rehabilitación de las células C6 (Figura 13 F y G). Por otra parte, al sensibilizar con TMZ (17.2 mM) por 24h y posteriormente tratar con las DL_{50} de PAN y LW, se observó una reducción significativa de la viabilidad, además de procesos de muerte necróticos (Figura 13 H).

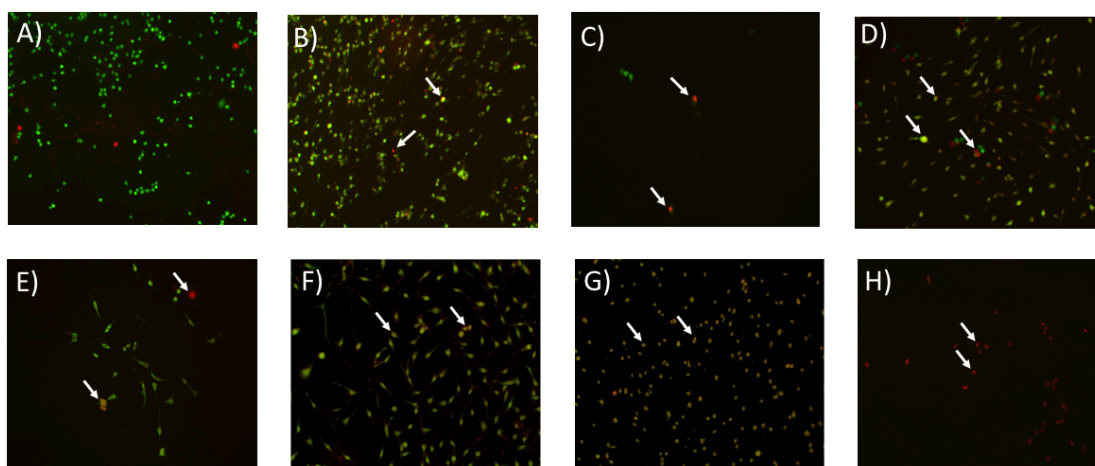


Figura 13. Micrografías de tipo de muerte celular en la línea celular C6. 100,000 células C6 fueron cultivadas (A) y tratadas con distintas concentraciones de TMZ (B) 8.6 y (C) 43 mM por 24h, LW (D) 1.92 y (E) 4.8 mg/mL por 24h, PAN (F) 0.5 y (G) 25 μ M por 72h y (H) COM durante 24h en una atmósfera con 5% de CO_2 a 37°C, se retiró el tratamiento y se agregó medio DMEM para dejar las células crecer por 5 días, posteriormente se aplicó una tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio, se observaron las células en un microscopio de fluorescencia (20X).

8.4 Ensayo de recuperación celular

Se realizó una prueba de recuperación en las células de astrocitoma murino C6, encontrando que los tratamientos por 24 h con TMZ (21.5 mM) o LW (2.88 mg/mL) evitaron el crecimiento o proliferación celular al igual que el tratamiento con PAN (25 μ M) a las 72 h de tratamiento (Figuras 14, 15 y 17). Sin embargo esto no se logra cuando se dió tratamiento con PAN (0-25 μ M) durante 24 h (Figura 16). Por otro lado, se sensibilizó a las células con diferentes dosis de TMZ (0-43mM), y posteriormente se trato con PAN (DL_{50}) y LW (DL_{50}), se observa que las células no logran recuperarse a la concentración de 8.6 mM de TMZ y las DL_{50} de PAN y LW (Figura 18).

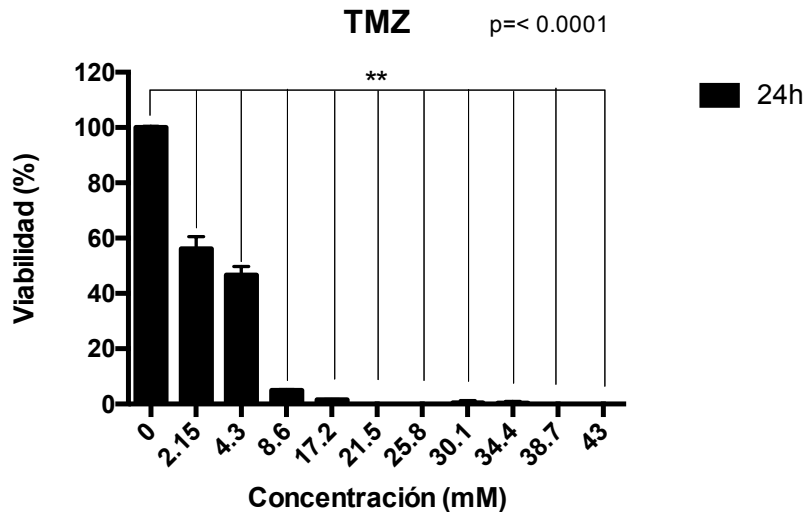


Figura 14. Prueba de recuperación de las células C6 tratadas con temozolomida (TMZ) durante 24 horas. 5,000 células C6 fueron tratadas con diferentes concentraciones de TMZ (0-43 mM) 24 horas. Posteriormente se retiró el tratamiento y se incubó la placa en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C por 5 días, se realizó la técnica de resazurina y se leyó la fluorescencia en un lector de placas (λ excitación y emisión a 530-590 nm). El gráfico respresenta el promedio de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

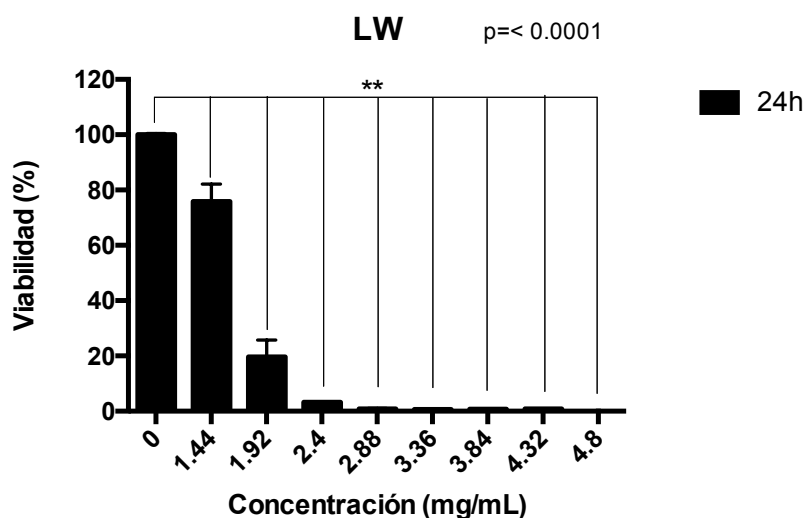


Figura 15. Prueba de recuperación de las células C6 tratadas con el extracto de *Lophophora williamsii* (LW) durante 24 horas. 5,000 células C6 fueron tratadas con diferentes concentraciones de LW (0.4-8 mg/mL) 24 horas. Posteriormente se retiró el tratamiento y se incubó la placa en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C por 5 días, se realizó la técnica de resazurina y se leyó la fluorescencia en un lector de placas (λ excitación y emisión a 530-590 nm). El gráfico respresenta el promedio de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

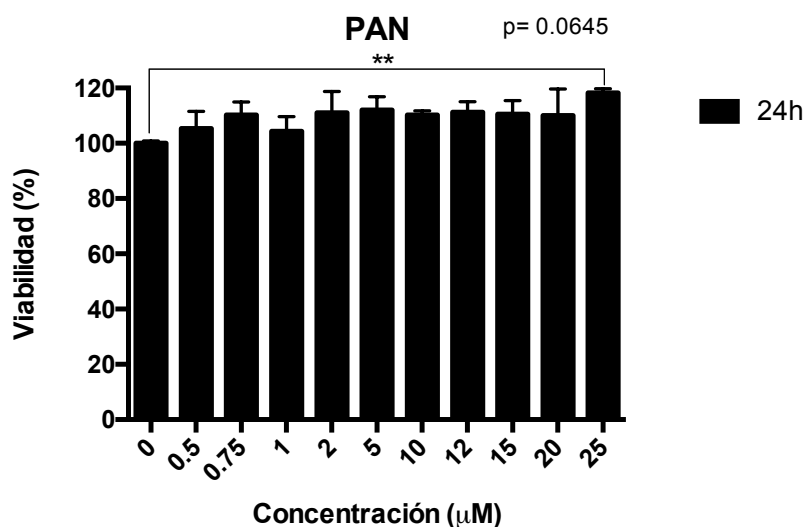


Figura 16. Prueba de recuperación de las células C6 tratadas con panobinostat (PAN) durante 24 horas. 5,000 células C6 fueron tratadas con diferentes concentraciones de PAN (0.5-25 μ M) 24 horas. Posteriormente se retiró el tratamiento y se incubó la placa en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C por 5 días, se realizó la técnica de resazurina y se leyó la fluorescencia en un lector de placas (λ excitación y emisión a 530-590 nm). El gráfico respresenta el promedio de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

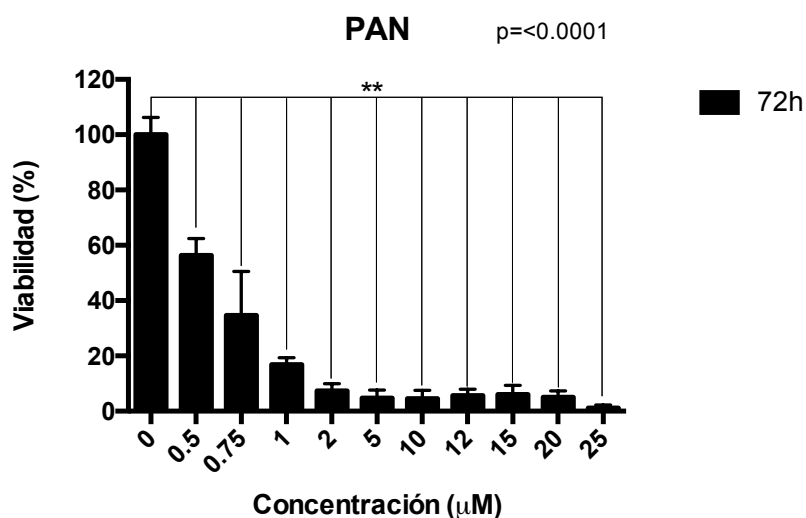


Figura 17. Prueba de recuperación de las células C6 tratadas con panobinostat (PAN) durante 72 horas. 5,000 células C6 fueron tratadas con diferentes concentraciones de PAN (0.5-25 μ M) 72 horas. Posteriormente se retiró el tratamiento y se incubó la placa en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C por 5 días, se realizó la técnica de resazurina y se leyó la fluorescencia en un lector de placas (λ excitación y emisión a 530-590 nm). El gráfico respresenta el promedio de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

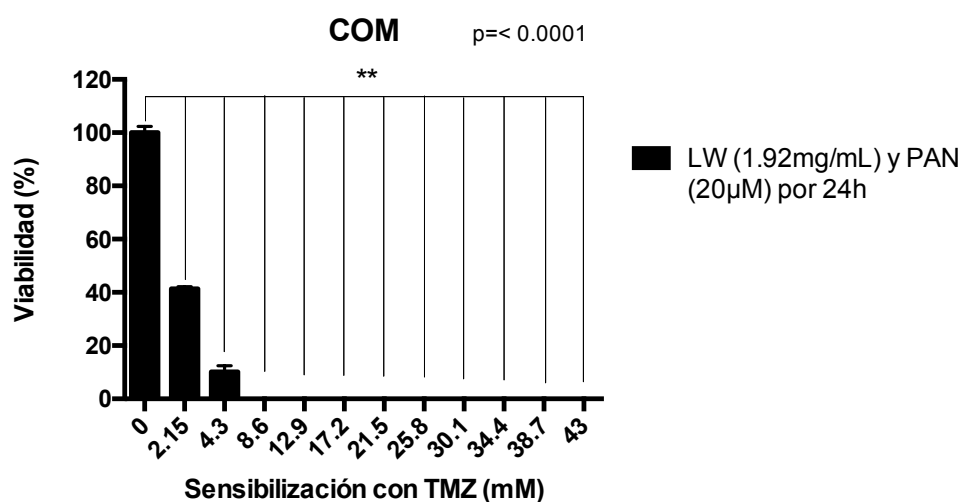


Figura 18. Efecto citotóxico de la temozolomida, el panobinostat y el extracto de *Lophophora williamsii* en la línea celular C6. 5,000 células C6 fueron tratadas con distintas concentraciones de TMZ (0-43 mM) durante 24h en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C, posteriormente se añadieron los tratamientos LW y PAN (1.92 mg/mL y 20 μ M respectivamente) correspondientes a las DL50 encontradas a las 24h, se retiró el tratamiento y se incubó la placa en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C por 5 días, se realizó la técnica de resazurina y se leyó la fluorescencia en un lector de placas (λ

excitación y emisión a 530-590 nm). El gráfico respresenta el promedio de 3 experimentos independientes \pm desviación estándar.

8.5 Efecto de los tratamientos (TMZ, LW, PAN y COM) en la liberación de DAMPs

No se observan diferencias en los valores de densidad óptica de DAMPs encontrados en los lisados celulares empleando TMZ, PAN o COM, en comparación con los valores de densidad óptica basales del control negativo, se observa solo diferencia significativa en los niveles basales de HSP90 del tratamiento LW en comparación al control sin tratar (Figura 19). Hay liberación de Damps en los sobrenadantes de las células C6 tratadas, se detecto mayor liberación de HMGB1Y HSP90 en el tratamiento PAN, asi como tambien mayor liberación de HSP70 en COM, sin embargo no se obseva diferencia significativa en ninguno, en comparación al su respectivo control (Figura 20).

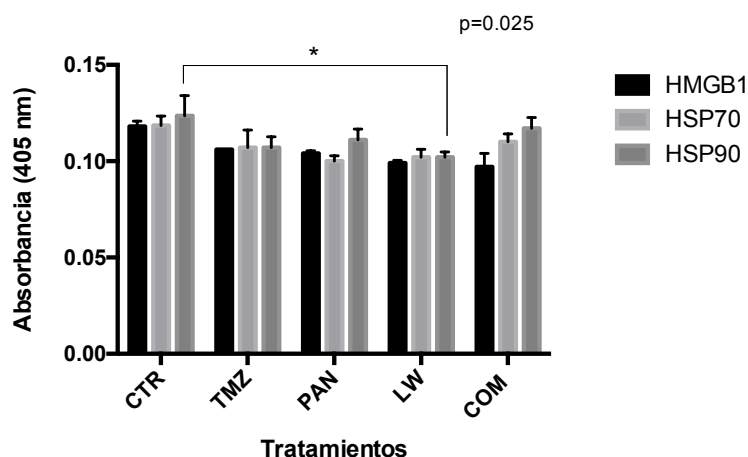


Figura 19. Niveles basales de DAMPs. 6 millones de células C6 fueron tratadas con distintos tratamientos: TMZ (43 mM por 24h), LW (4.8 mg/mL por 24 h), PAN (25 μ M durante 72h) y COM (TMZ a 12.9 mM por 24 h), posteriormente se añadieron los tratamientos LW y PAN (1.92 mg/mL y 20 μ M respectivamente) correspondientes a las DL50 encontradas a las 24h en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C, se realizó una extracción de proteína a los lisados celulares tratados. Mediante un ELISA indirecto se determinó la liberación de DAMPs (HMGB1, HSP 70 y HSP 90) con anticuerpos monoclonales, se agregó TMB como agente cromogénico para la peroxidasa de rabano en el conjugado,

se leyó la absorbancia a 405 nm El gráfico respresenta el promedio de 2 experimentos independientes \pm desviación estándar.

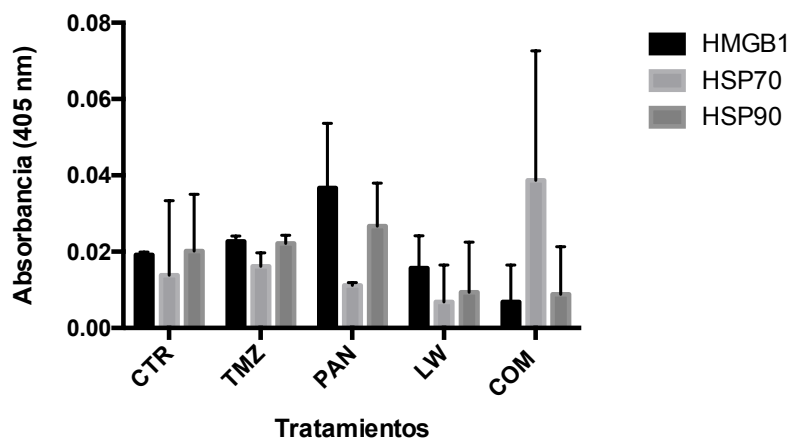


Figura 20. Liberación de DAMPs. 6 millones de células C6 fueron tratadas con distintos tratamientos: TMZ (43 mM por 24h), LW (4.8 mg/mL por 24 h), PAN (25 μ M durante 72h) y COM (TMZ a 12.9 mM por 24 h), posteriormente se añadieron los tratamientos LW y PAN (1.92 mg/mL y 20 μ M respectivamente) correspondientes a las DL50 encontradas a las 24h en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C, se realizó una extracción de proteína a los lisados celulares tratados. Mediante un ELISA indirecto se determinó la liberación de DAMPs (HMGB1, HSP 70 y HSP 90) con anticuerpos monoclonales, se agregó TMB como agente cromogénico para la peroxidasa de rabano en el conjugado, se leyó la absorbancia a 405 nm.

8.6 Efecto de las vacunas con lisados tumorales sobre el volumen tumoral

Al aplicar la vacunación en ratas con lisados celulares de células C6 tratadas previamente con TMZ, LW, PAN o COM para determinar la capacidad de inducir muerte inmunogénica y determinar si evitaba el crecimiento tumoral. Se encontró que ninguno de los tratamientos previno la implantación y desarrollo del tumor, mostrando un crecimiento exponencial en los días 10, 13 y 15 en el volumen tumoral con respecto al control y ligera reducción en los días 17 y 21. De todos los tratamientos evaluados el lisado celular derivado de la sensibilización con TMZ posteriormente tratados con PAN y LW, indujo un mayor volumen del tumor en todos los tiempos.

se observó crecimiento tumoral en todos los grupos vacunados con los distintos lisados celulares, encontrando diferencia significativa entre grupos los días 13 y 15 para el lisado celular de COM en comparación al control (CTR)(Figura 21).

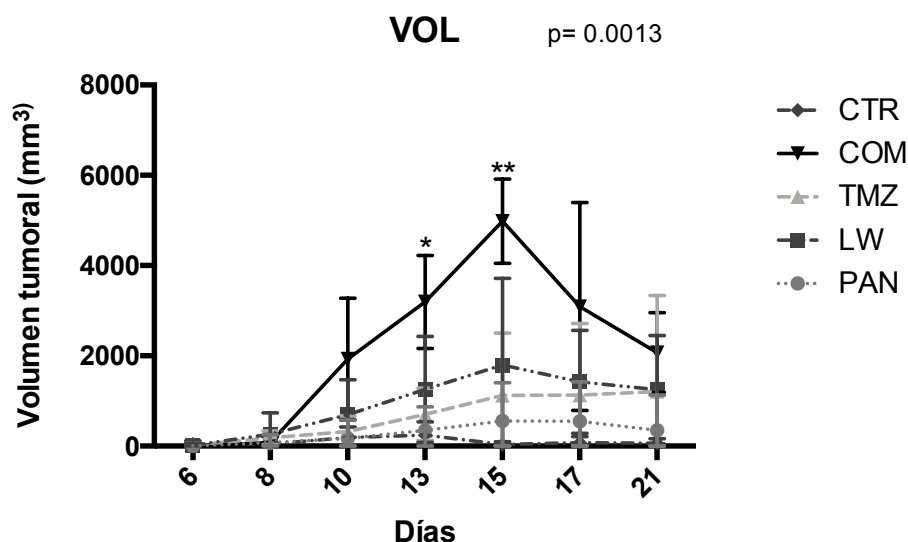


Figura 21. Medición del volumen tumoral. Ratas Wistar fueron inmunizadas con 2×10^6 células C6 lisadas con TMZ, PAN, LW y COM en el flanco izquierdo, al día 7 se realizó el reto, inoculando 5×10^6 células C6 viables en el flanco derecho. Se realizó la medición tumoral cada tercer día después de la aparición del tumor durante 15 días. N=6

9. DISCUSIÓN

La temozolomida, un agente alquilante, activado por cambios de pH y fármaco de segunda línea para el tratamiento del glioma, no se han realizado estudios para determinar si tiene la capacidad de inducir muerte inmunogénica (Alegría-Loyola et al., 2017). Sin embargo, en un estudio se determinó que el tratamiento con TMZ induce la liberación de algunos DAMPs como el ATP y la HMGB1, sin exposición de calreticulina en células de glioma murino y humano (Bezu et al., 2015). Nuestros resultados demuestran que la TMZ induce la liberación de HSP70, HSP90 y HMGB1 sobre la línea celular de glioma C6, sin embargo, comprobamos en un modelo in vivo que al momento de inocular las células previamente tratadas con la TMZ in vitro, no previno el crecimiento del tumor cuando se desafió con células viables de la línea celular C6, concluyendo que este compuesto no tiene la capacidad de inducir muerte inmunogénica. Estas observaciones correlacionan con el estudio de Park et al, 2010 el cual determina que en los pacientes de glioma tratados con TMZ, tenemos una disminución del tumor pero con recurrencia a los pocos meses (Park et al., 2010). Además encontramos que los mecanismos de muerte para TMZ fueron mediante apoptosis tardía, así como por necrosis. Corelacionando en parte con los resultados de Moghadam et al, 2018, el cual menciona que el proceso de muerte ejercido por la TMZ es mediante apoptosis (Moghadam et al., 2018), sobre líneas celulares de mioblastos y glioblastoma humano (Günther et al., 2003).

Nuestros resultados demuestran que en células C6 previamente tratadas con las dosis citotóxicas de TMZ durante 24h y posteriormente lavadas para retirar el compuesto y dejarlas en una prueba de recuperación por 5 días, corroborando la muerte de las células C6. En otro estudio donde probaron la TMZ en distintas líneas celulares de glioblastoma (A172, U251, U87 y U3439) observaron un efecto de pérdida de proliferación celular a la concentración de 50 μ M tratando por 5 días, sin embargo no se inhibió esta actividad celular en las líneas celulares C6 y U138 (Silva et al., 2016), esto último difiere de nuestro estudio, sin embargo hubo ciertas variantes que pudieron ocasionar la discrepancia, tales como la concentración y el tiempo.

En un estudio realizado por Wei Shen, et al, 2014 encontró que al tratar con TMZ (100 μ M) células de glioma humano (U251), se observa un efecto citotóxico bajo de 86 % de viabilidad a las 24 h y 75 % de viabilidad a las 48 h (Shen et al., 2014); por otro lado, en nuestro estudio se determinó que la TMZ sobre la línea celular C6, la concentración de 43 mM a las 24 h la viabilidad se reducía al 20%, mientras que a las 48 h desde la concentración de 30 mM se obtuvo una DL100.

El panobinostat ha mostrado tener efectos antitumorales y antiangiogénicos en glioma (Moore, 2016), no se han realizado estudios sobre muerte inmunogénica, los resultados obtenidos en este proyecto indican que no inducen esta modalidad de muerte en células de glioma murino al inocular en un modelo *in vivo* células C6 tratadas con PAN y posteriormente la inoculación de células C6 viables como desafío. Corroborando con el estudio de Maleszewska et al, 2014, que menciona que los inhibidores de histona deacetilasas generalmente inhiben la actividad enzimática (Maleszewska et al., 2014). Por ello en nuestros ensayos de liberación de DAMPs, probablemente el PAN no induce estrés celular suficiente para la liberación de HSP70, HSP90 y HMGB1 en altas concentraciones.

Se encontró que el mecanismo de muerte celular fue mediante apoptosis, lo que coincide con los resultados encontrados por Moore en 2016 (Moore, 2016), los cuales indican este tipo de muerte en mieloma múltiple.

No hay estudios para determinar citotoxicidad del PAN sobre la línea celular C6, sin embargo, en un estudio realizado por Maleszewska et al, 2014 se utilizaron distintos inhibidores de histona deacetilasas: ácido valproico (VPA), trichostatina (TSA), 3-deazaneplanocina (3DZNep), chatocina y BIX01294, sobre la línea celular de glioma murino C6. En los resultados que obtuvo se observa que el ácido valproico no tuvo efecto citotóxico, la chatocina y el BIX01294 tuvieron efecto dependiente de dosis y tiempo. Por otro lado, el 3DZNep y la trichostatina tienen su efecto citotóxico hasta las 48-72 h después de su tratamiento con dosis de 1-5 μ M para el primero 100-3000 nM para el segundo fármaco; lo que corrobora con nuestro estudio del PAN sobre la línea celular C6 en donde en un rango de dosis de 0-25 μ M el efecto citotóxico se observó hasta las 48-72h, posiblemente debido a que los inhibidores de HDACs también interactúan con otras proteínas como en el caso del ácido valproico, el cual interactúa

con canales de Ca_2^+ tipo T, deshidrogenasa de succinil amida i la GSK-3 β (Berendsen et al., 2012), por lo que podemos inferir que en dosis bajas y tiempos cortos los inhibidores de HDACs no afectan directamente a la cromatina.

Hay poca información sobre el efecto citotóxico de *L. williamsii* en líneas celulares de cáncer debido a su carácter como especie protegida, por lo que no hay estudios sobre muerte inmunogénica. En este proyecto, al inocular células C6 tratadas con LW al modelo murino, posteriormente desafiar con células viables, se observó crecimiento tumoral, estos resultados indican que el tratamiento con LW no induce muerte inmunogénica.

No hay reportes sobre la liberación de DAMPs en ninguna línea celular de cáncer tratando con LW, en nuestro estudio encontramos liberación de HSP70, HSP90 y HMGB1 en la línea celular de glioma murino C6.

Otro estudio realizado por Franco Molina (2003) determinó que un extracto metanolico de LW reduce la viabilidad de líneas celulares de linfoma y cáncer de mama (L5178Y-R y MCF7) en bajas concentraciones (18 $\mu\text{g/mL}$)(Franco-Molina et al., 2003), por otro lado, en los experimentos con la línea celular de glioma C6 se obtuvo reducción en la viabilidad con el extracto de LW, sin embargo a dosis mayores (4.8 mg/mL), debido a que la preparación del extracto fue distinta. Para determinar el tipo de muerte celular que ejerce el extracto metanolico de LW, se realizó una tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio, encontrando procesos de apoptosis temprana y tardía, esto se correlaciona con lo encontrado en células HeLa, con un extracto de LW, en donde observaron presencia de caspasa 3 mediante la tecnica de western blot (Zhi-Yu et al., 2011).

Los efectos de la combinación de tratamiento no fueron lo esperado, ya que no hubo efecto citotóxico sobre la línea celular C6 al combinar las DL20, DL30 Y DL50 de todos los agentes, esto quizá se deba a que la actividad antioxidante de LW inhibiera la producción de ROS que generan TMZ y PAN, lo que concuerda con el estudio de Giffioni, 2019; en donde determinó que los compuestos fenólicos de plantas en Cerrado, Brasil, inhibían la generación de ROS por quimioterapias como el paclitaxel y la vincristina para proteger células sanas (de Giffoni de Carvalho et al., 2019).

Para resolver el problema de los atioxidantes de LW inhibiendo la actividad de TMZ y PAN, se optó por una estrategia de sensibilización, en donde se altera la célula de cáncer ya sea por daño a DNA, por actividad epigénética, daño a mitocondría, etc. Dependiendo del mecanismo del fármaco o agente utilizado, concuerda con el estudio de Zhang en 2016, el cual menciona que para el tratamiento de cáncer, en especial los agresivos como el de pulmón y el de mama, se requieren procedimientos de sensibilización para debilitar la enfermedad y asegurar una buena sobrevivencia del paciente (Zhang and Zhang, 2016).

Dentro de nuestros resultados se encontró que ningún agente utilizado en este estudio (TMZ, LW, PAN y COM) inducen muerte celular inmunogénica, posiblemente a que dentro de las células se encontraban agentes citotóxicos que inhibieron la capacidad de nuestro sistema inmune para captar y procesar antígenos tumorales, así como de DAMPs. Las quimioterapias o distintos fármacos se utilizan en la medicina no solo para el tratamiento del cáncer, sino también, para tratar enfermedades autoinmunes o para evitar rechazo de tejidos, inhibiendo la actividad del sistema inmune (Rasmussen and Arvin, 1982). Por otro lado, este estudio abre las puertas para mejorar los tratamientos contra el glioma o cualquier otro tipo de cáncer, ya que la presencia de DAMPs no asegura que se monte una respuesta inmune específica de memoria, sino que se requieren observar otros parámetros para que sea un tratamiento exitoso y asegurar así una mejor sobrevivencia en pacientes con ésta enfermedad.

10.CONCLUSIONES

- Los tratamientos TMZ, PAN , LW y COM reducen la viabilidad de células de glioma C6.
- Los tratamientos TMZ, PAN, LW y COM inducen la liberación de patrones moleculares asociados a daño.
- Los tratamientos TMZ, PAN, LW y COM inducen muerte celular pero sin capacidad de inducir muerte inmunogénica.

11.PERSPECTIVAS

Como perspectivas a este trabajo se tiene determinar si la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Lophophora williamsii*, inhibe realmente la generación de especies reactivas de oxígeno por parte de TMZ y PAN en las células C6.

Modificar el esquema de vacunación, utilizar el sobrenadante para inmunizar a las ratas, ya que los DAMPs se liberan hacia el medio exterior al tratar las células con diversos agentes citotóxico.

Emplear un modelo de glioma en el cerebro de los murinos, mediante cirugía esterotáctica, para probar si los linfocitos T sensibilizados con la vacuna celular, se infiltran al SNC y ayudan a reducir el volumen tumoral, lo que daría la pauta para el siguiente paso de la aplicación preclínica.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Alegría-Loyola, M.A., Galnares-Olalde, J.A., Mercado, M., 2017. Tumors of the central nervous system. *Rev. Medica Inst. Mex. Seguro Soc.* 55, 330–340.
2. Barciszewska, A.-M., Gurda, D., Głodowicz, P., Nowak, S., Naskręt-Barciszewska, M.Z., 2015. A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells. *PLOS ONE* 10, e0136669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136669>
3. Berendsen, S., Broekman, M., Seute, T., Snijders, T., van Es, C., de Vos, F., Regli, L., Robe, P., 2012. Valproic acid for the treatment of malignant gliomas: review of the preclinical rationale and published clinical results. *Expert Opin. Investig. Drugs* 21, 1391–1415. <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.694425>
4. Bezu, L., Gomes-da-Silva, L.C., Dewitte, H., Breckpot, K., Fucikova, J., Spisek, R., Galluzzi, L., Kepp, O., Kroemer, G., 2015. Combinatorial Strategies for the Induction of Immunogenic Cell Death. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00187>
5. Cecil, R.L., Smith, L.H., Wyngaarden, J.B., 1986. *Tratado de medicina interna. Interamericana.* McGraw-Hill, México; Madrid [etc.
6. Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T., Robbins, S.L., 1999. *Robbins pathologic basis of disease.* Saunders, Philadelphia.
7. de Giffoni de Carvalho, J.T., da Silva Baldivia, D., Leite, D.F., de Araújo, L.C.A., de Toledo Espindola, P.P., Antunes, K.A., Rocha, P.S., de Picoli Souza, K., dos Santos, E.L., 2019. Medicinal Plants from Brazilian Cerrado: Antioxidant and Anticancer Potential and Protection against Chemotherapy Toxicity [WWW Document]. *Oxid. Med. Cell. Longev.* <https://doi.org/10.1155/2019/3685264>
8. de Robles, P., Fiest, K.M., Frolkis, A.D., Pringsheim, T., Atta, C., St. Germaine-Smith, C., Day, L., Lam, D., Jette, N., 2015. The worldwide incidence and prevalence of primary brain tumors: a systematic review and meta-analysis. *Neuro-Oncol.* 17, 776–783. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou283>
9. Fenger, C., Dutoit, S.H., 2003. Solid tumors. Classification based on molecular biology, prognosis and therapy. *Ugeskr. Laeger* 165, 905–907.
10. Ferro Sánchez, L., 2016. Efecto de fenotiazinas antipsicóticas en líneas celulares de glioma. *Universitat de les Illes Balears, España.*
11. Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R.M., Barregard, L., Bhutta, Z.A., Brenner, H., Dicker, D.J., Chimed-Orchir, O., Dandona, R., Dandona, L., Fleming, T., Forouzanfar, M.H., Hancock, J., Hay, R.J., Hunter-Merrill, R., Huynh, C., Hosgood, H.D., Johnson, C.O., Jonas, J.B., Khubchandani, J., Kumar, G.A., Kutz, M., Lan, Q., Larson, H.J., Liang, X., Lim, S.S., Lopez, A.D., MacIntyre,

- M.F., Marczak, L., Marquez, N., Mokdad, A.H., Pinho, C., Pourmalek, F., Salomon, J.A., Sanabria, J.R., Sandar, L., Sartorius, B., Schwartz, S.M., Shackelford, K.A., Shibuya, K., Stanaway, J., Steiner, C., Sun, J., Takahashi, K., Vollset, S.E., Vos, T., Wagner, J.A., Wang, H., Westerman, R., Zeeb, H., Zoeckler, L., Abd-Allah, F., Ahmed, M.B., Alabed, S., Alam, N.K., Aldhahri, S.F., Alem, G., Alemayohu, M.A., Ali, R., Al-Raddadi, R., Amare, A., Amoako, Y., Artaman, A., Asayesh, H., Atnafu, N., Awasthi, A., Saleem, H.B., Barac, A., Bedi, N., Bensenor, I., Berhane, A., Bernabé, E., Betsu, B., Binagwaho, A., Boneya, D., Campos-Nonato, I., Castañeda-Orjuela, C., Catalá-López, F., Chiang, P., Chibueze, C., Chittheer, A., Choi, J.-Y., Cowie, B., Damtew, S., das Neves, J., Dey, S., Dharmaratne, S., Dhillon, P., Ding, E., Driscoll, T., Ekwueme, D., Endries, A.Y., Farvid, M., Farzadfar, F., Fernandes, J., Fischer, F., G/hiwot, T.T., Gebru, A., Gopalani, S., Hailu, A., Horino, M., Horita, N., Husseini, A., Huybrechts, I., Inoue, M., Islami, F., Jakovljevic, M., James, S., Javanbakht, M., Jee, S.H., Kasaeian, A., Kedir, M.S., Khader, Y.S., Khang, Y.-H., Kim, D., Leigh, J., Linn, S., Lunevicius, R., El Razek, H.M.A., Malekzadeh, R., Malta, D.C., Marcenes, W., Markos, D., Melaku, Y.A., Meles, K.G., Mendoza, W., Mengiste, D.T., Meretoja, T.J., Miller, T.R., Mohammad, K.A., Mohammadi, A., Mohammed, S., Moradi-Lakeh, M., Nagel, G., Nand, D., Le Nguyen, Q., Nolte, S., Ogbo, F.A., Oladimeji, K.E., Oren, E., Pa, M., Park, E.-K., Pereira, D.M., Plass, D., Qorbani, M., Radfar, A., Rafay, A., Rahman, M., Rana, S.M., Søreide, K., Satpathy, M., Sawhney, M., Sepanlou, S.G., Shaikh, M.A., She, J., Shiue, I., Shore, H.R., Shrimel, M.G., So, S., Soneji, S., Stathopoulou, V., Stroumpoulis, K., Sufiyan, M.B., Sykes, B.L., Tabarés-Seisdedos, R., Tadese, F., Tedla, B.A., Tessema, G.A., Thakur, J.S., Tran, B.X., Ukwaja, K.N., Uzochukwu, B.S.C., Vlassov, V.V., Weiderpass, E., Wubshet Terefe, M., Yebyo, H.G., Yimam, H.H., Yonemoto, N., Younis, M.Z., Yu, C., Zaidi, Z., Zaki, M.E.S., Zenebe, Z.M., Murray, C.J.L., Naghavi, M., 2017. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* 3, 524. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5688>
12. Franco-Molina, M., Gomez-Flores, R., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R., Castillo-Leon, L., Rodríguez-Padilla, C., 2003. “In vitro” immunopotentiating properties and tumour cell toxicity induced by “*Lophophora williamsii*” (peyote) cactus methanolic extract: IMMUNOPOTENTIATION BY “LOPHOPHORA WILLIAMSII” EXTRACT. *Phytother. Res.* 17, 1076–1081. <https://doi.org/10.1002/ptr.1313>
 13. Gómez-Dantés, H., Lamadrid-Figueroa, H., Cahuana-Hurtado, L., Silverman-Retana, O., Montero, P., González-Robledo, M.C., Fitzmaurice, C., Pain, A., Allen, C., Dicker, D.J., Hamavid, H., López, A., Murray, C., Naghavi, M., Lozano, R., 2016. The burden of cancer in Mexico, 1990–2013. *Salud Pública*

México 58, 118–131.

14. Günther, W., Pawlak, E., Damasceno, R., Arnold, H., Terzis, A.J., 2003. Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. *Br. J. Cancer* 88, 463–469. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600711>
15. Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
16. Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L. (Eds.), 1997. Basic pathology, 6. ed. ed. Saunders, Philadelphia.
17. Liu, K., Liu, P., Liu, R., Wu, X., 2015. Dual AO/EB Staining to Detect Apoptosis in Osteosarcoma Cells Compared with Flow Cytometry. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 21, 15–20. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.893327>
18. Magaña-Maldonado, R., Chávez-Cortez, E.G., Olascoaga-Arellano, N.K., López-Mejía, M., Maldonado-Leal, F.M., Sotelo, J., Pineda, B., 2016. Immunological Evasion in Glioblastoma. *BioMed Res. Int.* 2016, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2016/7487313>
19. Maleszewska, M., Steranka, A., Kaminska, B., 2014. The effects of selected inhibitors of histone modifying enzyme on C6 glioma cells. *Pharmacol. Rep. PR* 66, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2013.08.011>
20. Moghadam, A.R., da Silva Rosa, S.C., Samiei, E., Alizadeh, J., Field, J., Kawalec, P., Thliveris, J., Akbari, M., Ghavami, S., Gordon, J.W., 2018. Autophagy modulates temozolomide-induced cell death in alveolar Rhabdomyosarcoma cells. *Cell Death Discov.* 4, 52. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0115-9>
21. Moore, D., 2016. Panobinostat (Farydak): A Novel Option for the Treatment of Relapsed Or Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *P T Peer-Rev. J. Formul. Manag.* 41, 296–300.
22. Park, J.K., Hodges, T., Arko, L., Shen, M., Dello Iacono, D., McNabb, A., Olsen Bailey, N., Kreisl, T.N., Iwamoto, F.M., Sul, J., Auh, S., Park, G.E., Fine, H.A., Black, P.M., 2010. Scale to predict survival after surgery for recurrent glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 3838–3843. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.0582>
23. Rasmussen, L., Arvin, A., 1982. Chemotherapy-induced immunosuppression. *Environ. Health Perspect.* 43, 21–25.
24. Rodríguez-Salazar, M.D.C., Franco-Molina, M.A., Mendoza-Gamboa, E., Martínez-Torres, A.C., Zapata-Benavides, P., López-González, J.S., Coronado-Cerda, E.E., Alcocer-González, J.M., Tamez-Guerra, R.S., Rodríguez-Padilla, C., 2017. The novel immunomodulator IMMUNEPOTENT CRP combined with chemotherapy agent increased the rate of immunogenic cell death and prevented melanoma growth. *Oncol. Lett.* 14, 844–852. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6202>
25. Rose, I.S. de, 2016. Notas sobre os usos contemporâneos do peiote. *Rev.*

- Antropol. 59, 337. <https://doi.org/10.11606/2179-0892.ra.2016.124829>
26. Shen, W., Hu, J.-A., Zheng, J.-S., 2014. Mechanism of temozolomide-induced antitumour effects on glioma cells. *J. Int. Med. Res.* 42, 164–172. <https://doi.org/10.1177/0300060513501753>
 27. Silva, A.O., Dalsin, E., Onzi, G.R., Filippi-Chiela, E.C., Lenz, G., 2016. The regrowth kinetic of the surviving population is independent of acute and chronic responses to temozolomide in glioblastoma cell lines. *Exp. Cell Res.* 348, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.09.014>
 28. Tortora, G.J., Tortora, G.J., 2014. Principles of anatomy & physiology, 14th edition.
 29. Zhang, X.-Y., Zhang, P., 2016. Sensitization strategies in lung cancer. *Oncol. Lett.* 12, 3669–3673. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5146>
 30. Zhi-Yu, Z., Xiao-Tao, S., Hao-Peng, Z., Xue-Li, S., Yao, Z., Jing-Wei, Z., Huan-Lin, X., Tao, S., Bao-Kuan, Z., 2011. Inhibitory and apoptosis-inducing effects of *Lophophora williamsii* extracts on HeLa cells. *J. Med. Plant Res.* 5.

13. RESUMEN BIOGRÁFICO

Luis Mario Madrigal de León

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: EVALUACIÓN DE LA TERAPIA CON TEMOZOLOMIDA, PANOBINOSTAT Y EXTRACTO DE *LOPHOPHORA WILLIAMSII* EN LA INDUCCIÓN DE MUERTE INMUNOGENICA EN UN MODELO MURINO DE GLIOMA

Campo de Estudio: Ciencias de la salud

Datos Personales: Nacido en Ciudad Madero, Tamaulipas, México el 16 de Octubre de 1995, hijo de Juan Mario Madrigal Martínez y Blanca Angélica de León Cruz.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2018. Tesis de licenciatura titulada: Evaluación *in vitro* y preclínica del tratamiento con rosa de bengala en melanoma y tumores benignos.

Experiencia Profesional: Ninguna.